

Zur Photosynthese der Purpurbakterien:
Reinigung und Eigenschaften
Chromatophor-gebundener Adenylatkinasen
unter Berücksichtigung einer praktikablen
Bakteriochlorophyllbestimmung

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Hartmut Neufang
aus Weimar

Zur Photosynthese der Purpurbakterien:
Reinigung und Eigenschaften
Chromatophor-gebundener Adenylatkinasen
unter Berücksichtigung einer praktikablen
Bakteriochlorophyllbestimmung

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Hartmut Neufang
aus Weimar

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 15. 2. 1983

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. K. Jacobs

Erstberichterstatter: Professor Dr. K. Knobloch

Zweitberichterstatter: Professor Dr. E. Kessler

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	9
2.1 Organismen	9
2.2 Nährmedien	9
2.3 Wachstumsbedingungen	11
2.4 Gewinnung des Zellmaterials	11
2.5 Gewinnung des zellfreien Extraktes	11
2.6 Präparative Methoden	12
2.6.1 Reversible Fällung von Protein mit Ammoniumsulfat	12
2.6.2 Chromatographische Verfahren	12
2.6.3 Elektrophoretische Verfahren (präp. IEF)	13
2.7 Analytische Verfahren	13
2.7.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	13
2.7.2 Molekulargewichtsbestimmungen	14
2.7.2.1 Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Diskelektrophorese auf Polyacrylamidgelen	14
2.7.2.2 Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelpermeationschromatographie	15
2.7.2.3 Molekulargewichtsbestimmung mittels Hochauflösungsflüssigkeitschromatographie	16
2.7.3 Kinetische Messungen	16
2.7.3.1 Bestimmung der Adenylatkinase-Aktivität	16
2.7.3.1.1 Photometrische Bestimmung der Adenylatkinase-Aktivität	16
2.7.3.1.2 Bestimmung der Adenylatkinase-Aktivität mittels des Luciferin-Luciferase-Systems	17
2.7.3.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten	17
2.7.4 Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI-Wert)	18

	Seite
2.7.4.1 pI-Wert Bestimmung mittels präparativer IEF	18
2.7.4.2 pI-Wert Bestimmung mittels analytischer IEF	18
2.7.5 Bestimmung des Proteingehaltes von Lösungen	19
2.7.6 Spektralphotometrie	19
2.7.7 Bestimmung des Bakteriochlorophyllgehaltes	19
2.7.7.1 Bestimmung des BChl-Gehaltes im wässrigen Medium bei 375 nm	19
2.7.7.2 Bestimmung des BChl-Gehaltes durch Extraktion nach van Niel und Arnold	20
2.7.7.3 Bestimmung des BChl-Gehaltes durch Extraktion nach Smith und Benitez	21
2.7.7.4 Bestimmung des BChl-Gehaltes durch Extraktion nach Clayton	22
2.7.7.5 Bestimmung des BChl-Gehaltes im wässrigen Medium bei 880 nm nach Clayton	22
2.7.7.6 Bestimmung des BChl-Gehaltes von ganzen Zellen im wässrigen Medium	23
2.7.8 Chemikalien	23
3. Ergebnisse	25
3.1 Die Adenylatkinasen aus <u>R. palustris</u> , <u>R. sphaeroides</u> und <u>R. rubrum</u>	25
3.1.1 Nachweis der Adenylatkinase-Aktivität	25
3.1.2 Reinigung und Isolierung der Adenylatkinasen	26
3.1.2.1 Ammoniumsulfatfällungen	29
3.1.2.2 Gelfiltrationschromatographie an Sephacryl S 300 Superfine	29
3.1.2.3 Präparative IEF bzw. Anionenaustauschromatographie	33
3.1.2.4 Gelfiltrationschromatographie an Sephadex G-75	35
3.1.2.5 Protein- und Aktivitätsausbeute	36

III

	Seite
3.1.3 Charakterisierung der Adenylatkinasen	36
3.1.3.1 Reinheit der Enzyme	36
3.1.3.1.1 PA-Diskelektrophorese verschiedener Anreicherungs-schritte der Enzyme	38
3.1.3.1.2 SDS-Diskelektrophorese der gereinigten Enzyme	41
3.1.3.2 Stabilität der Adenylatkinasen	41
3.1.3.2.1 Hitze- und Kältestabilität	41
3.1.3.2.2 pH-Stabilität	41
3.1.3.3 Molekulargewichtsbestimmungen	43
3.1.3.3.1 Untereinheiten	46
3.1.3.4 pI-Wert Bestimmung	46
3.1.3.4.1 pI-Wert über präp. IEF	46
3.1.3.4.2 pI-Wert über analytische IEF	46
3.1.3.5 Kinetische Daten	46
3.1.3.5.1 Metallionenspezifität der Enzyme	46
3.1.3.5.2 Michaelis-Menten-Konstanten	51
3.1.3.6 Spektren der Adenylatkinasen	62
3.2 Die Bakteriochlorophyllbestimmung in wässrigem Medium bei 375 nm	63
3.2.1 Ermittlung der millimolaren Extinktions- koeffizienten bei 375 nm	68
3.2.2 Linearität und Empfindlichkeit der ein- gesetzten Bestimmungsmethoden	70
3.2.3 Vollständigkeit der Extraktion bei den eingesetzten Methoden	73
3.2.4 Störanfälligkeit der Methoden	73
3.2.5 Reproduzierbarkeit der Methoden	80
3.2.6 Die Bakteriochlorophyllbestimmung in ganzen Zellen in wässrigem Medium bei 375 nm	80
4. Diskussion	83
4.1 Die Adenylatkinasen aus <u>R. palustris</u> , <u>R. sphaeroides</u> und <u>R. rubrum</u>	83
4.2 Die Bakteriochlorophyllbestimmung bei 375 nm	96

	Seite
5. Zusammenfassung	101
5.1 Die Adenylatkinasen aus <u>R. palustris</u> , <u>R. sphaeroides</u> und <u>R. rubrum</u>	101
5.2 Die Bakteriochlorophyllbestimmung in wässrigem Medium bei 375 nm	102
6. Literaturverzeichnis	103
Anhang	

Abkürzungen

AP ₅ A	P ¹ ,P ⁵ -Di(adenosin-5') pentaphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
BChl	Bakteriochlorophyll
<u>C. vinosum</u>	<u>Chromatium vinosum</u>
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
ϵ	Millimolarer Extinktionskoeffizient
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
HPLC	Hochauflösungsflüssigkeitschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
MG	Molekulargewicht
pI	Isoelektrischer Punkt
<u>R. acidophila</u>	<u>Rhodopseudomonas acidophila</u>
<u>R. capsulata</u>	<u>Rhodopseudomonas capsulata</u>
<u>R. palustris</u>	<u>Rhodopseudomonas palustris</u>
<u>R. sphaeroides</u>	<u>Rhodopseudomonas sphaeroides</u>
<u>R. rubrum</u>	<u>Rhodospirillum rubrum</u>
SDS	Natriumdodecylsulfat
S 144	Überstandsfraktion der Zentrifugation bei 144 000 x g
P 144	Sedimentfraktion der Zentrifugation bei 144 000 x g
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546217_0029

Einleitung

Eine intakte Energieökonomie der lebenden Zelle ist die Voraussetzung für ihre physiologisch einwandfreie Funktion. Die Regelung des Zellstoffwechsels hängt wesentlich auch von der jeweiligen Lage des Energiehaushaltes ab. Dieser wird durch ein komplexes System nebeneinander vorliegender Enzyme weitgehend über die Konzentration an Adeninnukleotiden geregelt.

Die Adenylatkinase = ATP:AMP-Phosphotransferase (EC 2.7.4.3) ist ein wichtiges Enzym des Energiestoffwechsels. Sie ist über die Kontrolle des Adenylat-Pools an der Regulation der Adeninnukleotidkonzentration in tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Zellen beteiligt und daher für das Verständnis der Zusammenhänge im Energiestoffwechsel der Zelle von großem Interesse.

Die genaue Funktion der Adenylatkinase in der Zelle wird verschieden interpretiert.

Untersuchungen verschiedener Präparationen in bezug auf ihre AMP, ADP und ATP-Konzentration unter differierenden Stoffwechselbedingungen zeigte eine erstaunliche Konstanz dieser Konzentrationen (Bomssel und Pradet 1968). Erklärt wird dies mit der adeninspezifischen Adenylatkinase-Aktivität; d.h. die Adenylatkinase gleicht jede extreme Abweichung von den "Normalwerten" der Adeninnukleotide sofort aus und sorgt so für eine stabile Gleichgewichtslage.

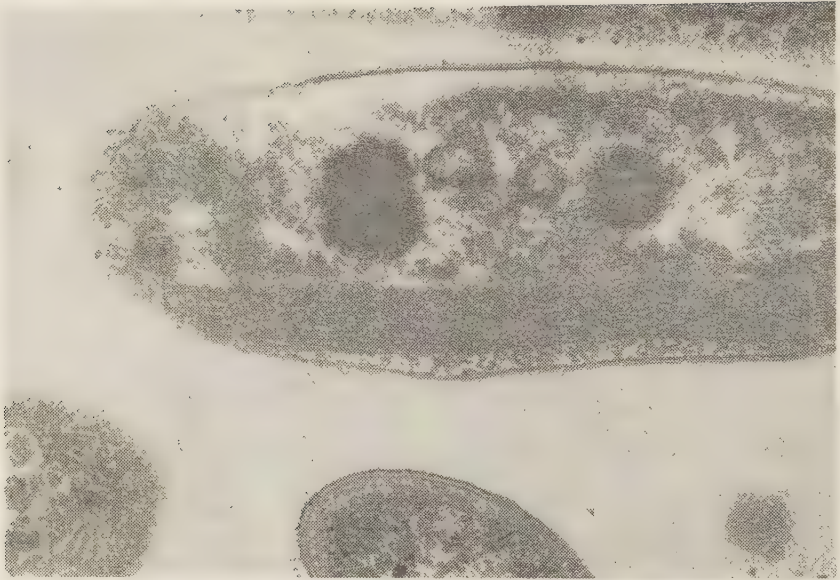


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Dünnschnittes einer Zelle von R. palustris nach Fixierung mit Glutaraldehyd-OsO₄. Gesamtvergrößerung 62 500 fach (1 cm = 0,16 µm). Aufnahme Dr. G. Acker



Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Dünnschnittes einer Zelle von R. sphaeroides nach Fixierung mit Glutaraldehyd- OsO_4 . Gesamtvergrößerung 57 000 fach (1 cm = 0,175 μm). Aufnahme Dr. H.J. Burkhardt

So ist die Umwandlung von ADP, welches in hohen Konzentrationen als Inhibitor mancher Enzymsysteme wirkt, eine wichtige Aufgabe der Adenylatkinase (Noda 1973).

In neuerer Zeit wurden in Pflanzenzellen auch speziellere Funktionen der Adenylatkinase gefunden (Hatch 1982). Hatch sieht als spezifische Aufgabe der Adenylatkinase in C_4 -Pflanzen die Remobilisierung von AMP in direkter Folge an eine der Schlüsselreaktionen bei der C_4 -Photosynthese: die Regeneration des primären CO_2 -Akzeptors Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat. So konnte von ihm schon früher gezeigt werden, daß Blätter von C_4 -Pflanzen eine hohe Adenylatkinaseaktivität aufweisen im Vergleich zu C_3 -Pflanzen (Hatch und Kagawa 1973).

Die Adenylatkinase katalysiert folgende Reaktion:



Sie ist weit verbreitet in Geweben, in denen der Energiestoffwechsel über Adeninnukleotide groß ist, wie z.B. in Muskeln oder Mitochondrien.

In den verschiedensten tierischen Geweben wurde die Adenylatkinase schon früher untersucht (Colowick und Kalckar 1943, Callaghan und Weber 1959). Diese Muskeladenylatkinase wurde lange Zeit als Myokinase bezeichnet.

Pflanzliche Adenylatkinasen wurden unter anderem von Karu und Moudrianakis (1969) und Murakami und Strotmann (1978) beschrieben. Erst kürzlich wurde das Enzym aus Maisblättern teilgerereinigt (Hatch 1982). Mikrobielle Enzyme wurden von Holmes und Singer (1973) und von Terai (1974) isoliert.

Die Verteilung der Adenylatkinasen in den Zellen ist uneinheitlich.

In tierischen Geweben sind zwei Isoenzyme, der sogenannte Leber- oder Mitochondrien- und der Muskeltyp, identifiziert worden. Der Lebertyp ist zwischen der äußeren und inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, der Muskeltyp im Cytosol (Brdiezka 1968).

Das Hefeenzym wurde von Chiu et al. (1967) als zu 90 % im löslichen Überstand und zu 10 % in mikrosomalen und mitochondrialen Fraktionen nachweisbar beschrieben. Das Enzym aus Ps. denitrificans konnte nur in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden (Terai 1974).

Bei den pflanzlichen Adenylatkinasen ist zwischen einer löslichen Adenylatkinase und einer membrangebundenen Adenylatkinase unterschieden worden (Murakami und Strotmann 1978).

Die Proteinstruktur der Adenylatkinasen wird in Zusammenhang mit der Taxonomie und dem evolutionären Stand des entsprechenden Organismus gesehen (Noda 1973, Terai 1974). Unter diesem Gesichtspunkt werden

die Enzyme aus Ps. denitrificans und aus E. coli als in ihren biochemischen Eigenschaften ähnlich beschrieben; die Übereinstimmung mit dem Hefeenzym wird als nicht so groß angesehen (Terai 1974). Über Adenylatkinasen aus Purpurbakterien wurde bis jetzt nicht berichtet.

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der Adenylatkinasen aus den Purpurbakterien Rhodopseudomonas palustris, Rhodopseudomonas sphaeroides und Rhodospirillum rubrum. Die dadurch gewonnenen Daten können, im Vergleich mit untersuchten Adenylatkinasen anderer Organismen, die Klärung folgender Fragen erleichtern:

Wo befindet sich die Adenylatkinase in der Zelle?
Handelt es sich um ein lösliches oder ein membran-gebundenes Enzym?

Welche genaue Funktion hat die Adenylatkinase in den untersuchten Organismen und welcher Reaktionsmechanismus liegt zugrunde?

Inwieweit stimmt die nahe Verwandtschaft der untersuchten Organismen mit der Ähnlichkeit ihrer Adenylatkinasen überein?

Um eine in der Praxis wenig aufwendige und zuverlässige Vergleichsbasis experimenteller Daten neben dem Protein-gehalt einsetzen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine einfache und sichere Bakteriochlorophyllbestimmungsmethode entwickelt.

Die quantitative Bakteriochlorophyllbestimmung in ganzen Zellen oder Chromatophorpräparationen von photosynthetisch aktiven Bakterien hat in der Laborpraxis eine wichtige Funktion, da der Bakteriochlorophyllgehalt als Bezugsgröße zum Vergleich verschiedener photochemischer und biochemischer Aktivitäten eingesetzt wird.

Die Bestimmung nach den herkömmlichen Methoden läuft auf die Extraktion des Bakteriochlorophylls mit organischen Lösungsmitteln hinaus (van Niel und Arnold 1938, Smith und Benitez 1955, Cohen-Bazire et al. 1957, Clayton 1963a).

Diese Extraktionsmethoden sind zeitaufwendig und problematisch in der Durchführung: Bei der Extraktion mit Methanol nach Smith und Benitez und bei der mit Aceton/Methanol nach Clayton bzw. Cohen-Bazire et al. besteht einerseits die Schwierigkeit, das Bakteriochlorophyll wirklich quantitativ in die organische Phase zu überführen, andererseits ist Bakteriochlorophyll in organischen Lösungsmitteln licht- und oxidationsempfindlich.

Van Niel und Arnold bestimmen das Bakteriochlorophyll indirekt, nach Umwandlung in das stabilere Bakterio-pheophytin.

Die Bestimmung des Bakteriochlorophyllgehalts im wässrigen Medium bei 880 nm nach Clayton (1963b) umgeht diese Fehlerquelle. Der Schwachpunkt dieser Bestimmungsmethode ist jedoch die Tatsache, daß die Spektren der Präparationen bei dieser Wellenlänge mit dem Alter der Kultur, der Art der Elektronenquelle im Nährmedium und der Lichtstärke während des Wachstums Differenzen aufweisen (Biebl und Drews 1969, Thornber, Trosper und Strouse 1978).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird eine neue Bakteriochlorophyllbestimmungsmethode beschrieben, die die Nachteile der herkömmlichen Methoden vermeidet. Im Vergleich mit den anderen, oben erwähnten Methoden weist sie folgende Vorteile für die praktische Arbeit auf: hohe Reproduzierbarkeit, schnelle, einfache Ausführung, Unempfindlichkeit gegen Störeinflüsse und geringer Material- und Arbeitsaufwand.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Organismen

Untersucht wurden folgende Organismen: Chromatium vinosum (ATCC 17899), Rhodopseudomonas acidophila (ATCC 25092), Rhodopseudomonas capsulata (ATCC 11166), Rhodopseudomonas palustris (ATCC 11168), Rhodopseudomonas sphaeroides (ATCC 17023) und Rhodospirillum rubrum (ATCC 11170).

C. vinosum ist ein sogenanntes "Schwefelpurpurbakterium" und gehört zur Familie der Chromatiaceae. Die anderen Organismen sind sogenannte "schwefelfreie Purpurbakterien" und gehören in die Familie der Rhodospirillaceae. (Trüper und Pfennig 1978).

2.2 Verwendete Nährmedien

Die oben genannten Organismen wurden photoheterotroph bzw. photolithoautotroph auf den folgenden Nährmedien angezogen:

Für das photoheterotrophe Wachstum von R. acidophila, R. capsulata, R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum wurde ein Medium, modifiziert nach Knobloch et al. (1971), verwendet (s. Tab. 1).

Tab. 1: Medium für photoheterotrophes Wachstum von R. acidophila, R. capsulata, R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum modifiziert nach Knobloch et al. (1971).

Angaben für 1 l Medium in mg

Äpfelsäure	720	Hefeextrakt	20
Natriumhydroxid	500	Zinksulfat	0,1
Ammoniumchlorid	400	Borsäure	0,3
Magnesiumsulfat	400	Kobaltchlorid	0,2
Natriumchlorid	200	Natriummolybdat	0,03
Kaliumdihydrogenphosphat	500	Manganchlorid	0,03
Calciumchlorid	50	Nickelchlorid	0,02
Eisensulfat	10	Kupferchlorid	0,01

Diese Lösung wurde auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt und eine Stunde lang bei 121 °C und 1,5 bar autoklaviert.

Für das photolithoautotrophe Wachstum von R. palustris mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ als Elektronenquelle wurde das Medium nach Knobloch et al. (1971) verwendet.

Für das photolithoautotrophe Wachstum von C. vinosum wurde das anorganische Medium nach Fuller (s. Bose 1963) verwendet.

2.3 Wachstumsbedingungen für photosynthetisches Wachstum

Beleuchtungsstärke: 10 000 Lux
Temperatur : 25 °C
Kulturgefäße : 10 l Glaskolben
anaerobe Bedingungen

Die genannten Bedingungen wurden zur Anzucht aller verwendeten Organismen eingesetzt.

2.4 Gewinnung des Zellmaterials

Die Zellen wurden gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase, nach 48 Stunden Wachstum, mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge (WKF G 50 K) bei 4 °C und 10 000 x g abzentrifugiert. Die so erhaltene Zellpaste, ca. 1,5 g pro l Kulturflüssigkeit, wurde einmal mit Tris-HCl-Puffer (0,05 M, pH 8,0) gewaschen.

2.5 Gewinnung der zellfreien Extrakte

Die gewaschene Zellpaste (s. 2.4) wurde in Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) mit Hilfe eines Handhomogenisators homogenisiert und durch Ultraschallbehandlung (Labsonic 1510, Braun Melsungen 400 W, 20 kHz) in Intervallen von einer Minute aufgeschlossen. Die so behandelte Suspension wurde dann für 30 Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert (WKF-Zentrifuge G 50 K), um so nicht aufgeschlossene Zellen

und große Zellbruchstücke zu sedimentieren. Der Überstand dieser Zentrifugation, das sogenannte S 10, wurde für 100 Minuten bei 144 000 x g ultrazentrifugiert (Ultrazentrifuge Spinco L 250 B Beckman). Es resultierte daraus eine zellfreie Überstandsfraktion S 144 und das Sediment P 144, die Chromatophoren.

2.6 Präparative Methoden

2.6.1 Reversible Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat

Zu der nach 2.5 hergestellten Überstandsfraktion S 144 wurden langsam steigende Mengen Ammoniumsulfat zugesetzt und so die Proteine fraktioniert ausgefällt. Die jeweiligen Fraktionen wurden 15 Minuten bei 20 000 x g zentrifugiert (WKF-Zentrifuge G 50 K) und das pelletierte Protein nach Abgießen des Überstands in einem geringen Volumen Puffer (Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,0) gelöst.

2.6.2 Gelchromatographie

Die verschiedenen Gelmaterialien (Sephacryl S 300 Superfine, Sephadex G-75, Sephadex G-100, Sepharose 4 B, DEAE Sephadex A-50) wurden nach den Herstellerangaben vorbereitet und in die entsprechenden Chromatographiesäulen eingefüllt. Eluiert wurde mit Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) bzw. mit einem linearen $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ -Gradienten von 50-175 mM für die Anionenaustauschersäule.

2.6.3 Elektrophoretische Verfahren

Als Stromquelle bei allen eingesetzten elektrophoretischen Verfahren diente ein Netzteil der Firma LKB (2197 Power Supply).

Präparative isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die präparative IEF wurde im granulierten Gelbett (Sephadex G-50 fine) unter Zusatz von 4 ml Ampholine 4-6 und 1 ml Ampholine 6-8 zur Ausbildung eines pH-Gradienten durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese (18 h, 15 W) wurde der Verlauf des pH-Gradienten mittels einer Oberflächenelektrode (Einstabmesskette LOT-403-M8, Ingold) bestimmt, die fokussierten Proteine aus dem, in entsprechende Fraktionen eingeteilten, Gelbett mit wenig Puffer eluiert und auf ihre Enzymaktivität überprüft.

2.7 Analytische Verfahren

2.7.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden entweder mit Röhrchengelen (6 x 150 mm) oder mit Dünnschichtgelplatten (2 mm Schichtdicke) durchgeführt. Die Herstellung der Gele und die einzelnen Rezepturen hierfür wurden nach Blauch, R. (1978), Fehrnström, H. und Moberg, K. (1977), Maurer, H.R. (1971), Weber, K. und Osborne, M. (1969) und Winter et al. (1975) zusammengestellt und modifiziert. Der Acrylamidanteil ($\hat{=}$ % T) bei den Röhrchengelen und

Dünnschichtplatten betrug 7 %, der "crosslinker"-Anteil ($\hat{=}$ % C) 1,5 %. Für die analytische IEF wurden zur Ausbildung eines pH-Gradienten 2,5 ml Ampholine 4-6 und 1,0 ml Ampholine 6-8 zugesetzt. Ausgeführt wurde die analytische IEF in einer LKB Multiphor Electrophorese Unit (4 °C, 15 W, 4 h, Ausmessen des pH-Gradienten s. 2.6.3).

Bei der SDS-Gelelektrophorese wurden Gele mit T = 10 %, C = 1,5 % und 0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat) benutzt. Die vertikale SDS-Gradientengelelektrophorese wurde in einer LKB Vertical Electrophoresis Unit mit 16 x 18 cm Platten durchgeführt. Ein Trenngel mit einem linearen Gradienten von 4 - 22 % Acrylamid wurde eingesetzt. Zur Markierung der Lauffront diente bei allen Elektrophoreseverfahren eine Bromphenolblaulösung. Angefärbt wurden die Proteinbanden mit Coomassie brilliant blue (Serva Heidelberg).

Bei den SDS-Elektrophoresen wurden die Proben vor dem Auftragen auf die Gele 5 Minuten in Phosphatpuffer (pH 7,1) mit 2 % SDS und 1 % Mercaptoethanol auf 100 °C erhitzt und so in die Untereinheiten gespalten.

2.7.2 Molekulargewichtsbestimmungen

2.7.2.1 Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Diskelektrophorese auf Polyacrylamidgelen

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen bzw.

Proteinuntereinheiten auf SDS-Gelen (Weber und Osborn 1969; Maurer 1971; Blauch 1978) wurde vorgegangen wie oben beschrieben. Die eingesetzten Vergleichsproteine wurden ebenso behandelt. Nach dem Anfärben der Proteinbanden wurden die jeweiligen Rf-Werte bestimmt (Verhältnis aus Gesamtlaufstrecke, gekennzeichnet durch den "Frontmarker" und Laufstrecke des jeweiligen Proteins bzw. der Untereinheit). Zur Berechnung der Molekulargewichte wurden die dekadischen Logarithmen der Molekulargewichte der Vergleichssubstanzen gegen ihren Rf-Wert in ein Diagramm aufgetragen und aus der sich ergebenden Eichgeraden das Molekulargewicht der Probe bestimmt.

2.7.2.2 Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelpermeation

Die Bestimmung der Molekulargewichte mittels Gelfiltration (Andrews 1964; Sosa 1980; Whitaker 1963) wurde über eine mit Sephadex G-75 (Pharmacia) gefüllte Säule (2,5 x 50 cm) ausgeführt. Die dekadischen Logarithmen der Molekulargewichte der Vergleichsproteine wurden in einem Diagramm gegen die aus den Elutionskurven errechneten Elutionsvolumina (ml) aufgetragen. Aus der so entstandenen Eichgeraden konnten die Molekulargewichte der untersuchten Proben bestimmt werden.

2.7.2.3 Molekulargewichtsbestimmung mittels der Hochauflösungs- flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Bestimmung der Molekulargewichte mit Hilfe der Hochauflösungsflüssigkeitschromatographie (Regnier und Gooding 1980) wurde mittels eines Kontron HPLC-Systems mit variablem Wellenlängendetektor, an den ein Schreiber angeschlossen war, und einer Varian TSK 3000 SW-Trennsäule durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 276 nm. Die dekadischen Logarithmen der Molekulargewichte der Vergleichsproteine wurden gegen die jeweiligen Elutionsvolumina (ml) in einem Diagramm aufgetragen. Aus der resultierenden Eichgeraden konnten die Molekulargewichte der Proben ermittelt werden.

2.7.3 Kinetische Messungen

2.7.3.1 Bestimmung der Adenylatkinase-Aktivität

2.7.3.1.1 Photometrische Bestimmung der Adenylatkinase-Aktivität

Adenylatkinase-Aktivität wurde durch die Messung des gebildeten ATP in einem gekoppelten enzymatischen Test photometrisch über die Absorptionzunahme durch NADP^{+} -Reduktion bei 340 nm (Oliver 1955; Terai 1974) bestimmt. Gemessen wurde in 1 cm-Glasküvetten bei Raumtemperatur gegen einen Reagenzienblindwert.

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml: 150 μM Tris-HCl pH 8,0, 15 μM MgCl_2 , 30 μM Glucose,

0,2 mg Hexokinase (aus Hefe, Boehringer Mannheim), 0,7 Einheiten Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (Boehringer Mannheim), 0,6 μM NADP^+ und 1,5 μM ADP. Vor dem Start mit 10 - 20 μl Enzymlösung wurde der Reaktionsansatz 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.7.3.1.2 Bestimmung der Adenylatkinase-Aktivität mittels des Luciferin-Luciferase-Systems

Hierbei wurde die Menge des gebildeten ATP über das Luciferin-Luciferase-System (Lundin et al. 1976) in einem speziellen Luminometer mit angeschlossenem Schreiber gemessen. Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml: 75 μM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM ADP, 1 mM MgCl_2 und 50 μl LKB ATP Monitoring Reagent. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 μg Protein gestartet und jeder Ansatz wurde durch Zugabe einer bekannten ATP-Menge geeicht. Gemessen wurde in 1 cm Glasküvetten bei 25 °C.

2.7.3.2 Bestimmung und Berechnung der Michaelis-Menten-Konstanten

Zur Bestimmung der K_m - bzw. K_i -Werte wurde die ATP-Bildung durch das Enzym mit Hilfe des in 2.7.3.1.2 beschriebenen Tests bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels Diagrammen nach Lineweaver-Burk bzw. Dixon. (Dixon und Webb 1979). Hierbei wurden die reziproken Werte der Stoffumsatzraten

gegen die reziproken Werte der Substratkonzentrationen bzw. gegen die Hemmstoffkonzentration aufgetragen. Durch Verbinden der errechneten Koordinatenpunkte ergab sich eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der Abszisse den Wert für die Michaelis-Menten-Konstante darstellt. Der K_i -Wert ergab sich durch den Schnittpunkt der beiden bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelten Geraden.

2.7.4 Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI-Wert)

2.7.4.1 pI-Bestimmung mittels präparativer IEF

Die präparative IEF wurde als Anreicherungsmethode eingesetzt (s. 2.6.3). Nach dem Ausmessen des künstlich erzeugten pH-Gradienten (s. 2.6.3) und dem Bestimmen der enzymhaltigen Fraktionen durch Aktivitätsmessung konnte diesen ein relativ enger pI-Bereich zugeordnet werden.

2.7.4.2 pI-Bestimmung mittels analytischer IEF

Auf einer nach 2.7.1 hergestellten Polyacrylamidgelplatte wurden gereinigte Adenylatkinasen einer analytischen IEF unterzogen (s. 2.7.1). Mit Hilfe einer Oberflächen-elektrode (s. 2.6.3) wurde der pH-Gradient (durch künstliche Ampholyte erzeugt) über die ganze Laufstrecke vermessen. Durch Auswerten des pH-Gradienten in Abhängigkeit von der Gesamtlaufstrecke und Ein-

setzen der Laufstrecke des angefärbten Proteins ließ sich der pI-Wert der Proben bestimmen.

2.7.5 Bestimmung des Proteingehaltes von Lösungen

Zur quantitativen Bestimmung des Proteingehaltes von Lösungen wurde die Methode nach Lowry et al. (1951) eingesetzt. Mit Rinderserumalbumin als Standard wurde eine Eichkurve erstellt, aus der die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden konnte.

2.7.6 Spektralphotometrie

Die Absorptionsspektren und die photometrischen Bestimmungen der Adenylatkinase-Aktivität, des Proteingehaltes und des BChl-Gehaltes wurden in einem Shimadzu UV 210 A Double Beam Spectralphotometer durchgeführt. Zur Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren wurde ein Perkin-Elmer 650-10 S Fluorescence Spectrophotometer verwendet.

2.7.7 Bestimmung des Bakteriochlorophyllgehaltes

2.7.7.1 Bestimmung des Bakteriochlorophyllgehaltes im wässrigen Medium bei 375 nm

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode beruht auf der photometrischen Messung der Absorption von bakteriochlorophyllhaltigen, wässrigen Ansätzen bei 375 nm (Neufang

et al. 1982a). Um Transparenz der zu bestimmenden Proben zu gewährleisten, wurde die als S 10 bezeichnete Präparation (s. 2.5) für 15 Minuten bei 20 000 x g zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde, wie unter 2.5 beschrieben, in S 144 und die bakteriochlorophyllhaltigen Chromatophoren, das P 144, aufgetrennt. Die so gewonnene Chromatophorpräparation konnte im Homogenisator (Potter S, B. Braun Melsungen) in Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) bis zur Transparenz homogenisiert werden. Von dieser Präparation wurde, nach entsprechender Verdünnung mit Puffer, gegen Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) als Referenz die Extinktion bei 375 nm bestimmt. Mit Hilfe des entsprechenden millimolaren Extinktionskoeffizienten für 375 nm (s. 3.2) konnte der BChl-Gehalt, berechnet als Bakteriochlorophyll a, sofort ermittelt werden (Formel unter 3.2.2).

2.7.7.2 Bestimmung des Bakteriochlorophyllgehaltes durch Extraktion nach van Niel und Arnold

Die Bestimmung des BChl-Gehaltes nach van Niel und Arnold (1938) beruht auf der quantitativen Überführung des mit Methanol extrahierten Bakteriochlorophylls (s. 2.7.7.5) in das gegen Licht- und Lufteinflüsse unempfindlichere Bakteriopheophytin. Die zu untersuchende bakteriochlorophyllhaltige Präparation wurde mit der 10-fachen Menge Methanol versetzt und das BChl möglichst quantitativ

extrahiert. Nach Zentrifugation (5 min 4000 U/min) wurde der klare Überstand zu einer Mischung von 1,5 ml Tetrachlorkohlenstoff und 0,1 ml 25 %iger Salzsäure gegeben. Die Extinktion dieses Gemisches wurde dann im Photometer bei 667,8 nm gegen einen entsprechenden Lösungsmittelblindwert gemessen. Über den spezifischen Absorptionskoeffizienten für Bakteriopheophytin bei 667,8 nm ($11,13 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) konnte der BChl-Gehalt der Probe bestimmt werden.

2.7.7.3 Bestimmung des Bakteriochlorophyllgehaltes durch Extraktion nach Smith und Benitez

Nach Smith und Benitez (1955) wird der BChl-Gehalt direkt nach der Extraktion mit Methanol bei 772 nm gemessen und über den mM Extinktionskoeffizienten für BChl in Methanol bei 772 nm ($\epsilon = 70 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) berechnet. Die zu bestimmende Probe wurde mit der 10-fachen Menge Methanol möglichst quantitativ extrahiert, zentrifugiert (Tischzentrifuge Junior O Heraeus Christ GmbH, 5 min, 4000 U/min), der klare Überstand abgegossen und sofort bei 772 nm im Photometer gegen Methanol als Referenz gemessen. Über den entsprechenden mM Extinktionskoeffizienten konnte der BChl-Gehalt der Probe berechnet werden.

2.7.7.4 Bestimmung des Bakteriochlorophyllgehaltes durch Extraktion nach Clayton

Nach Clayton (1963a) wird das BChl aus der Probe mit einem Gemisch aus Aceton/Methanol 7/2 (v/v) extrahiert und bei 772 nm gemessen.

Die Probe wurde mit der 10-fachen Menge Aceton/Methanol versetzt und möglichst quantitativ extrahiert, zentrifugiert (Tischzentrifuge Junior O Heraeus Christ GmbH, 5 min, 4000 U/min) und dann abgegossen. Der klare Überstand wurde dann im Photometer bei 772 nm gegen einen Lösungsmittelblindwert gemessen. Über den entsprechenden mM Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 75 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) konnte der BChl-Gehalt der Probe bestimmt werden.

2.7.7.5 Bestimmung des Bakteriochlorophyllgehaltes im wässrigen Medium bei 880 nm nach Clayton

Eine andere Bakteriochlorophyllbestimmung nach Clayton (1963b) sieht die Messung der Absorption der wässrigen Probe bei 880 nm vor.

Die wässrige bakteriochlorophyllhaltige Präparation wurde hergestellt wie unter 2.7.7.1 beschrieben und dann im Photometer bei 880 nm gegen einen entsprechenden Blindwert gemessen.

Über den entsprechenden millimolaren Extinktionskoeffizienten konnte der BChl-Gehalt der Probe berechnet werden (ϵ für R. rubrum bei 880 nm = $140 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.7.7.6 Bestimmung des Bakteriochlorophyllgehaltes in ganzen Zellen durch Messung im wässrigen Medium

Die Bestimmung des BChl-Gehaltes von ganzen Zellen wurde durchgeführt, indem die gewaschenen Bakterienzellen mit Hilfe eines Schüttlers gleichmäßig in 3 ml einer 30 %igen Rinderserumalbuminlösung homogenisiert und dann, wie unter 2.7.7.1 beschrieben, gegen einen entsprechenden Blindwert gemessen wurden. Die Berechnung des BChl-Gehaltes erfolgte, wie unter 2.7.7.1 angegeben.

2.7.8 Chemikalien

Firma Boehringer, Mannheim:	ATP, ADP, AMP, NADP^+ , Hexokinase (Hefe), Glucose-6-Phosphatdehydro- genase
Firma LKB, Gräfelfing:	ATP-Monitoring-Reagent, Ampholine
Firma Merck, Darmstadt:	Mercaptoethanol, Temed, DC-Platten, Tris-HCl, Methylenbisacrylamid, Folin- Ciocalteus-Reagenz
Firma Pharmacia, Freiburg:	Sephadex - Trennmaterialien, Sepharose - Trennmaterialien, Sephacryl - Trennmaterialien
Firma Sigma, München:	P^1 , P^5 -Di (adenosin-5') pentaphosphat

Firma Serva,
Heidelberg:

Acrylamid, Ammoniumperoxodisulfat,
Coomassie Brilliant-Blau R 250,
Eichproteine, N, N'-Methylenbisacry-
lamid, SDS, Glycin, Glycyl-Glycin

Alle übrigen verwendeten Chemikalien entsprachen dem
Reinheitsgrad "p.A.".

- 3 Ergebnisse
- 3.1 Die Adenylatkinasen aus R. palustris, R. sphaeroides
und R. rubrum
- 3.1.1 Nachweis der enzymatischen ATP-Bildung aus ADP durch
endogenes Protein aus R. palustris, R. sphaeroides und
R. rubrum

Die enzymatische ATP-Bildung aus ADP wurde auf zwei verschiedene Arten nachgewiesen (s. 2.7.3.1.1 und 2.7.3.1.2). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von definierten Mengen Enzympräparation gestartet. Die Reaktion nach Oliver (1955) bzw. Terai (1974) bei der die Zunahme der Absorption bei 340 nm gemessen wurde, erwies sich in der Praxis als zeitaufwendig und nicht so empfindlich wie die schnelle Luciferin-Luciferase-Reaktion nach Lundin et al. (1976). Bei den im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurde deshalb die Luciferin-Luciferase-Reaktion zum Nachweis der Enzymaktivität herangezogen. Hierbei befand sich die Küvette mit dem Reaktionsansatz (s. 2.7.3.1.2) in einem absolut lichtdichten Gerät. Durch Zugabe der Enzymprobe in die Küvette wurde die ATP-Bildung induziert. Das gebildete ATP wurde von dem Luciferin-Luciferase-Reagenz in Lichtemission umgesetzt. Die Stärke der Lichtemission wurde von einem hochempfindlichen Photomultiplier gemessen und über einen Verstärker in ein Schreibersignal verwandelt (Lundin et al. 1976).

Der Hauptteil der Adenylatkinase aller drei Bakterien konnte im nach 2,5 hergestellten Überstand S 144 nachgewiesen werden. Jedoch auch die nach 2,5 sedimentierten Chromatophoren (= P 144) zeigten je nach Behandlung (Dauer der Ultraschalleinwirkung, Häufigkeit des Waschens mit 0,05 M Tris-HCl pH 8,0) noch Adenylatkinase-Aktivität. In Tab. 2 ist die Verteilung der Adenylatkinase-Aktivität zusammengefaßt. Die Aktivität der Chromatophoren aus R. sphaeroides-und R. rubrum-Zellen zeigt sich um mehr als den Faktor 10 größer als die Adenylatkinase-Aktivität der R. palustris-Präparation. Nach zweimaligem Waschen war bei R. palustris-Chromatophoren keine Aktivität mehr meßbar, bei den Präparationen aus R. sphaeroides und R. rubrum war dies nach dreimaligem Waschen der Fall.

3.1.2 Isolierung und Reinigung der Adenylatkinasen

Da sich nach der Ultraschallbehandlung der Zellen und anschließender Zentrifugation (s. 2,5) 90 % der Adenylatkinase-Aktivität in der Überstandsfraktion S 144 befanden, wurde diese als Ausgangspräparation für die Reinigung und Isolierung benutzt.

Fig. 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Methoden und Reinigungsschritte, mit denen die Adenylatkinase aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum isoliert und bis zur Homogenität gereinigt wurde.

Tab. 2.: Adenylatkinase-Aktivität der Chromatophoren (P 144). Das P 144 wurde gewaschen, indem die Chromatophoren in Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) suspendiert und im Homogenisator homogenisiert wurden. Die durch Zentrifugation (60 Minuten bei 144 000 x g) dieser Suspension erneut sedimentierten Chromatophoren werden als "P 144, 1 x gewaschen" bezeichnet.

Präparation	Adenylatkinase-Aktivität [nmol ATP gebildet · mg BChl ⁻¹ · min ⁻¹]		
	<u>R. palustris</u>	<u>R. sphaeroides</u>	<u>R. rubrum</u>
P 144 unbehandelt	2,4	32,5	29,0
P 144 1 x gewaschen	0,5	15,2	13,5
P 144 2 x gewaschen	0	7,0	6,2
P 144 3 x gewaschen	0	0	0

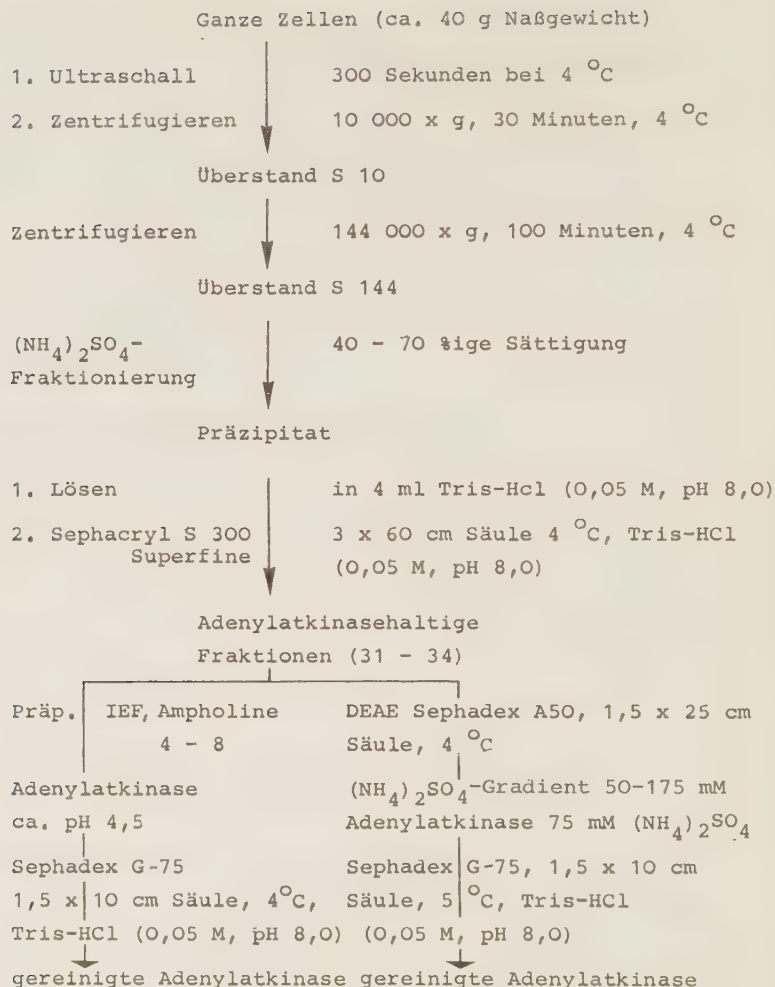


Fig. 1.: Isolierungs- und Reinigungsschema der Adenylat-
kinasen aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum

3.1.2.1 Ammoniumsulfatfällung

Die reversible Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat wurde als erster Reinigungsschritt der Adenylatkinasen durchgeführt. In der Fraktion von 40-70 %iger Sättigung befanden sich 44 % des Gesamtproteins und die Hauptadenylatkinase-Aktivität aller drei Organismen (s. Tab. 3).

3.1.2.2 Gelfiltrationschromatographie

Die Fraktion des von 40-70 % Ammoniumsulfatsättigung ausgefällten Proteins wurde in wenig (ca. 4 ml) Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) gelöst, für 10 Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert, um eine klare Proteinlösung zu erhalten und dann auf eine mit Sephacryl S 300 Superfine gefüllte Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) bei einem Fluß von 10 ml pro Stunde.

Mit Hilfe dieses Säulenmaterials konnte die Adenylatkinasereinigung im Vergleich zu anderen eingesetzten Gelmaterialien (Sephacryl, Sephadex) erheblich verkürzt werden.

Die Hauptaktivität aller untersuchten Adenylatkinasen wurde in den Fraktionen 31-34 gefunden (s. Fig. 2). Diese wurden durch Ammoniumsulfatfällung konzentriert und weiteren Isolierungsschritten unterzogen.

Tab. 3.: Protein- und Adenylatkinase-Ausbeute aus S 144 (*R. palustris*) und den Fraktionen, die durch Zugabe steigender Mengen Ammoniumsulfat gefällt wurden. Das S 144 wurde aus 40 l Bakterienkultur (ca. 40 g Naßgewicht der Zellpaste) gewonnen. Die Werte gelten in etwa für alle drei Organismen.

Fraktion	Gesamtprotein		Enzymaktivität	
	[mg]	[%]	[$\mu\text{mol ATP} \cdot \text{min}^{-1}$]	[%]
S 144	2156	100	1330	100
0 - 20 % (NH_4) ₂ SO ₄	86,3	4	20	2
20 - 40 % (NH_4) ₂ SO ₄	366,5	17	150	11
40 - 70 % (NH_4) ₂ SO ₄	948,6	44	870	65
Überstand	754,6	35	300	22

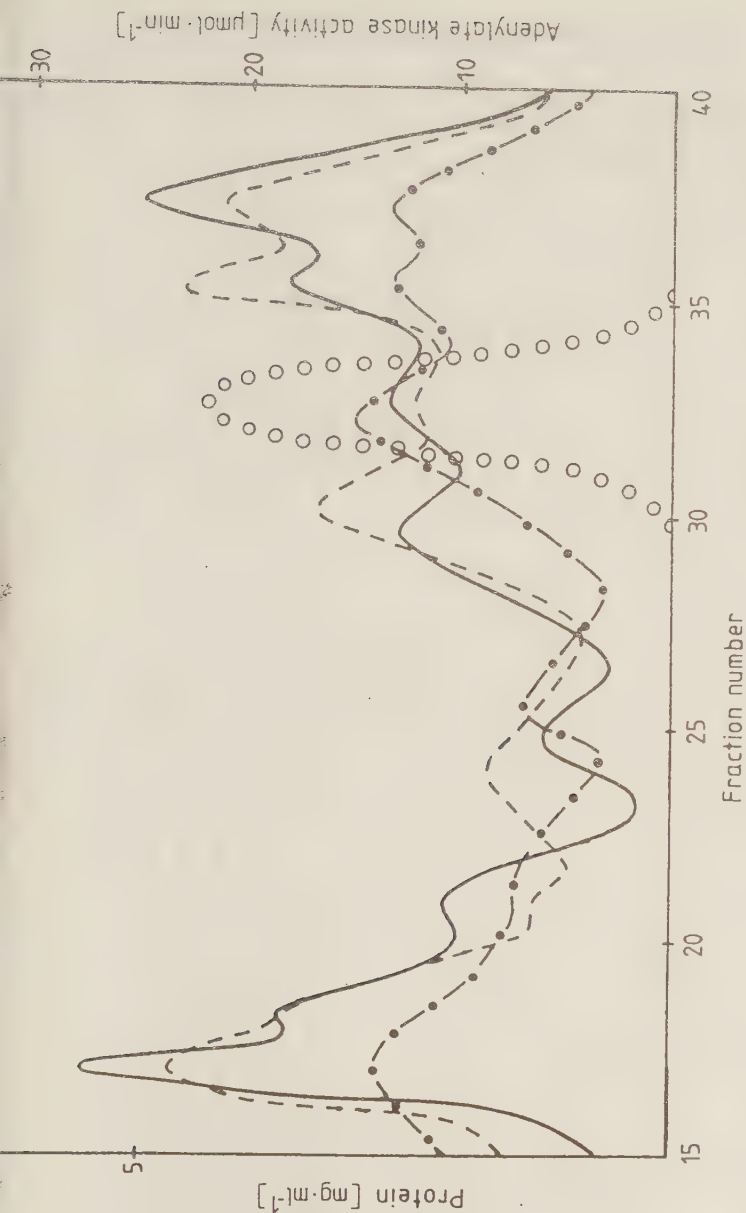


Fig. 2.: Elutionsdiagramme der 40-70 %igen Ammoniumsulfatfällung aus dem S 144 der Organismen R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum. Trenngel: Sephacryl S 300, Säulenmaße: 3,0 x 60 cm, Elutionsmittel: Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0), Elutionsgeschwindigkeit: 10 ml pro Stunde, Proteindetektion: Absorption bei 254 nm, Fraktionsvolumen: 5 ml. — R. rubrum-Proteine, - - - R. palustris-Proteine, ● - ● R. sphaeroides-Protein, ○ ○ ○ Adenylatkinase-Aktivität.

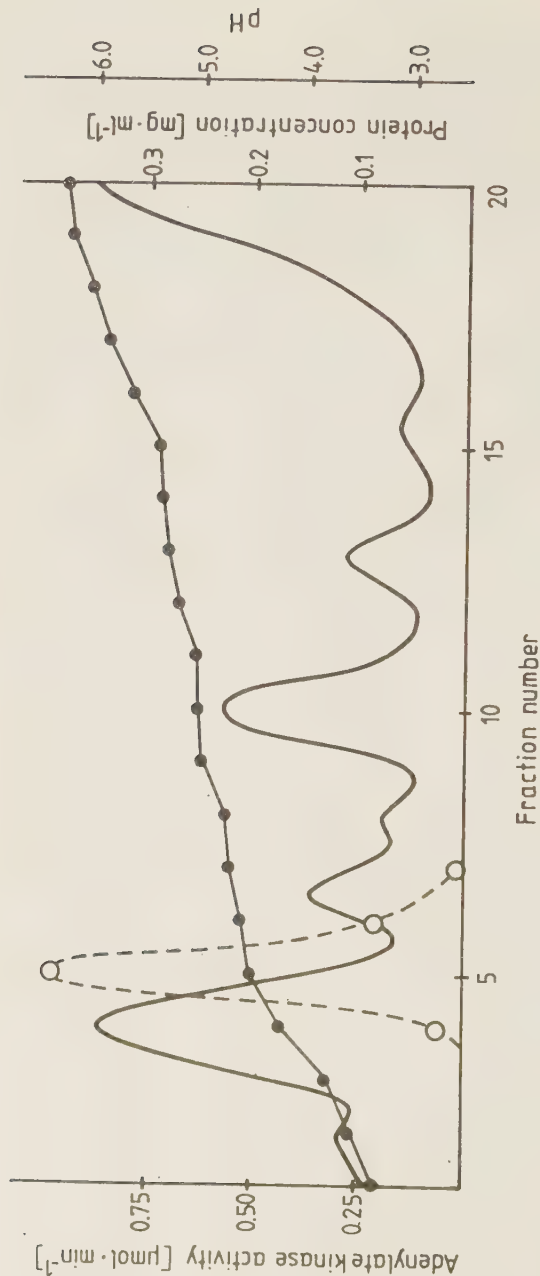


Fig. 3.: Isoelektrische Fokussierung der vereinigten aktiven Fraktionen des Sephacryl S 300 Säulenlaufes. Gelbett: Sephadex G-50 Fine, Ampholine 4-8, Laufzeit 18 Stunden, 15 W.
 — Proteinkonzentration; die Proteinkonzentration wurde in der Darstellung um den Betrag korrigiert, der durch die zugesetzten Ampholine verursacht wird. - - - Adenylatkinase-Aktivität; ●—pH-Gradient. Die Enzyme aus R. sphaeroides und R. rubrum ergaben ähnliche Diagramme, auf eine Darstellung wurde deshalb verzichtet.

3.1.2.3 Präparative IEF bzw. Anionenaustauscherchromatographie

Die eingeeengten, aktiven Fraktionen des Sephacryl S 300-Säulenlaufes wurden in das granuliertte Gelbett einer präparativen IEF eingebracht (s. 2.6.3). Nach Fokussierung über Nacht (18 Stunden) war die Trennung der Proteine beendet. Der durch die zugesetzten Ampholine (LKB) 4 - 6 bzw. 6 - 8 ausgebildete pH-Gradient erstreckte sich von pH 3,3 - 8,8. Adenylatkinase-Aktivität wurde in den Fraktionen 3 - 7 in einem pH-Bereich von 4,0 - 5,0 gemessen (s. Fig. 3). Der gleiche Trennerfolg ließ sich mittels einer Anionenaustauscher-Gelchromatographie mit DEAE Sephadex A-50 und einem linearen Ammoniumsulfat-Gradienten von 50 - 175 mM in Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) erzielen. Die Adenylatkinase aller untersuchten Bakterien wurde bei ca. 75 mM Ammoniumsulfat eluiert (s. Fig. 4). Da der Einsatz der präparativen IEF gegenüber der Anionenaustauschersäule keinen Vorteil zeigte, jedoch viel arbeits- und auch kostenintensiver war, wurde im allgemeinen als dritter Reinigungsschritt die DEAE-Sephadex A 50-Säule eingesetzt.

Aus den Adenylatkinase-Aktivitäts-Bestimmungen mit den Fraktionen der präparativen IEF ging außerdem hervor, daß der lange Einfluß des elektrischen Stromes eine Schädigung der Enzymaktivität zur Folge hatte. Ein negativer Effekt des Ammoniumsulfat-Gradienten auf die Adenylatkinase wurde nicht festgestellt.

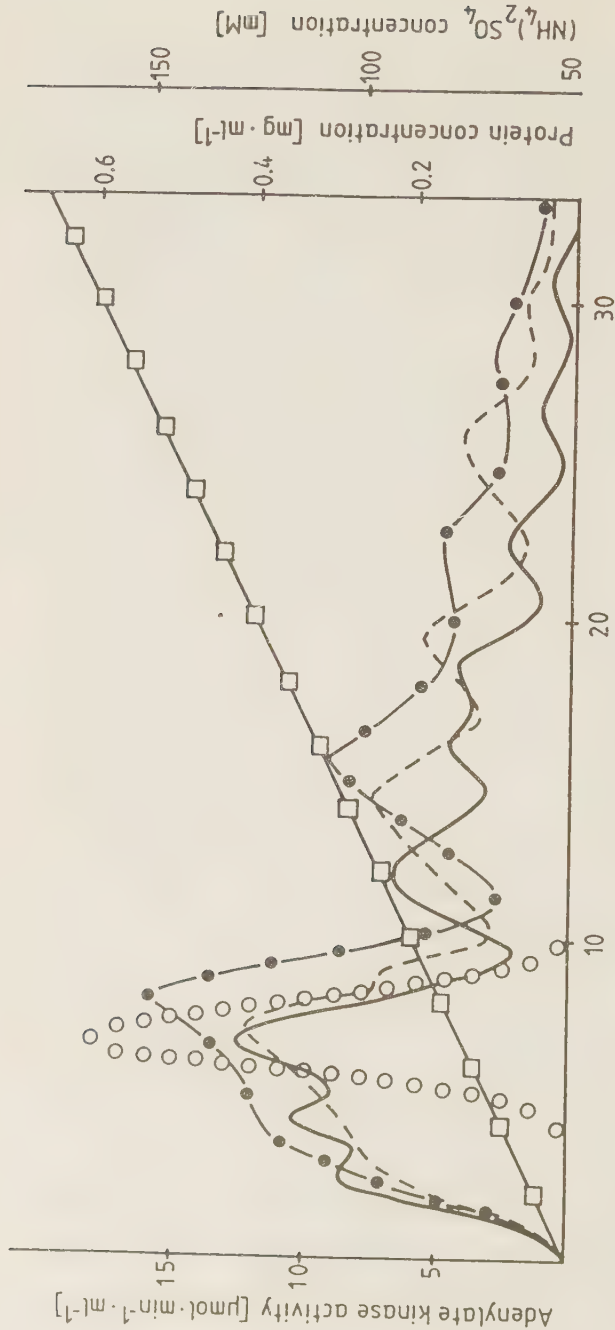


Fig. 4.: Elutionsdiagramme der vereinigten Fraktionen 31 - 34 der Sephacryl S 300 Säulenläufe der Organismen R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum, Trenngel: DEAE Sephadex A-50 Anionen-austauscher, Säulenmaße: 1,9 x 25 cm, Elutionsmittel: 400 ml Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) mit einem linearen Gradienten von 50 - 175 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Elutionsgeschwindigkeit: 7,5 ml pro Stunde, Fraktionsvolumen 2,5 ml.
 —○— R. rubrum, —□— R. palustris, —●— R. sphaeroides, —○— $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradient, 1000l Adenylatkinase-Aktivität.

3.1.2.4 Gelfiltrationschromatographie an Sephadex G 75

Die eingeeengten, aktiven Fraktionen der präparativen IEF bzw. der DEAE Sephadex A-50-Anionenaustauscher-Säule wurden über eine kleine Sephadex G-75-Säule gegeben. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 5 ml pro Stunde und es wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt (s. Fig. 5).

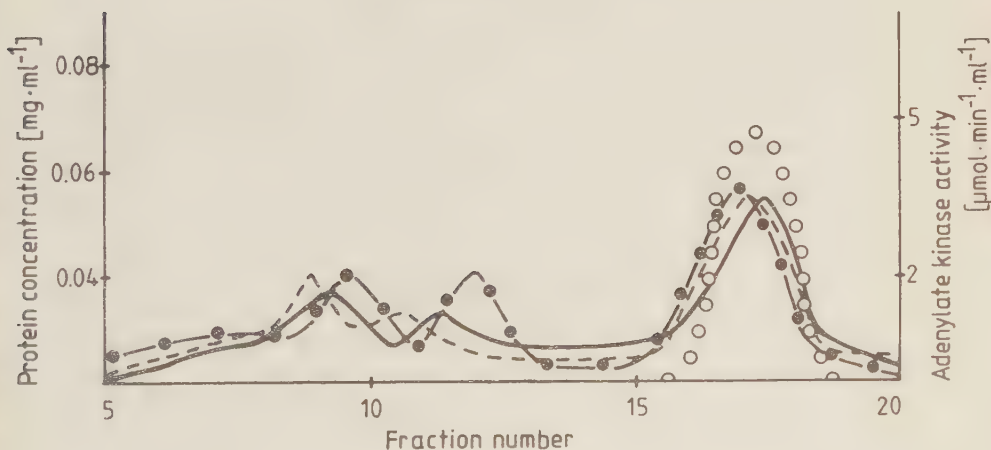


Fig. 5.: Elutionsdiagramme der vereinigten Fraktionen 7-8 der DEAE Sephadex A-50 Anionenaustauscher-Säulenläufe der Organismen *R. palustris*, *R. sphaeroides* und *R. rubrum*. Trenngel: Sephadex G-75, Säulenmaß: 1,5 x 10 cm, Elutionsmittel: Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0), Elutionsgeschwindigkeit: 5 ml pro Stunde, Fraktionsvolumen: 1 ml. —●— *R. rubrum*, - - - *R. palustris*, —●— *R. sphaeroides*, 1000 Adenylatkinase-Aktivität

Wie aus Fig. 5 hervorgeht, wurden durch diesen abschließenden Reinigungsschritt nicht nur das Ammoniumsulfat der Anionenaustauscher-Säule entfernt, sondern die letzten verunreinigenden Proteine abgetrennt. Nach diesem Säulenlauf wurden nur noch die Fraktionen mit einer konstanten spezifischen Aktivität weiter untersucht.

3.1.2.5 Protein- und Aktivitätsausbeute

Tab. 4 gibt einen Überblick über die Ausbeute an Protein und Enzymaktivität. Die Adenylatkinase aller drei untersuchten Bakterien stellt ca. 0,5 % des im S 144 enthaltenen Gesamtproteins dar, d.h. aus 1 g Protein im Überstand S 144 konnten 5 mg homogenes Enzym angereichert werden. Die endgültige spezifische Adenylatkinase-Aktivität lag im Bereich von 70 bis 80 μMol gebildetem ATP pro Minute und pro mg Protein für alle drei Organismen. Die Steigerung der spezifischen Aktivität, ausgehend vom S 144, betrug somit ca. das 200-fache.

3.1.3 Charakterisierung der Adenylatkinase aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum

3.1.3.1 Reinheit der Enzyme

Nach jedem der in 3.1.2.1 - 3.1.2.4 durchgeführten Schritte wurde der Erfolg mit Hilfe von Diskelektrophorese auf PAGE-Röhrchen und nach dem letzten Reinigungsschritt auch durch SDS-Diskelektrophorese auf PAGE-Röhrchen und ver-

Tab. 4.: Zusammenfassung der Reinigung der Adenylatkinase aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum. Die Reinigung wurde, wie im Text beschrieben, durchgeführt, Protein und Adenyltkinaseaktivität gemessen wie unter 2.7.5 bzw. 2.7.3.1.2 angegeben. Ausgegangen wurde von je 40 l Bakterienkultur.

Fraktion	Gesamtprotein [mg]		Gesamtaktivität [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$]		Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]				
	R.pal.	R.sphaer.	R.rub.	R.pal.	R.sphaer.	R.rub.	R.pal.	R.sphaer.	K. rub.
S 144	2950	3150	2710	1330	1350	1085	0,5	0,4	0,4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fällung (40-70 %)	1120	1150	1025	1280	1290	1080	1,1	1,1	1,1
Eluat der Sephacryl S 300 Säule	360	360	320	1260	1260	1095	3,5	3,5	3,4
Eluat der pröp. IEF	-	-	-	1070	1030	910	-	-	-
Eluat der DEAE Seph. A-50 Säule	50	50	45	1220	1250	10,45	24,4	25,0	23,2
Eluat der Seph. G-75 Säule	15	14	12	1160	1110	920	77,3	79,3	76,7

tikale SDS-Gradientengelelektrophorese (s. 2.7.1) überprüft.

3.1.3.1.1 PA-Diskelektrophorese verschiedener Anreicherungs- schritte der Enzyme

Die zunehmende Reinheit der jeweiligen Präparation ließ sich an der abnehmenden Anzahl von Proteinbanden auf den entsprechenden PAGE-Röhrchen überprüfen. Auf dem letzten Gel war nur noch eine Proteinbande zu erkennen, was auf die Homogenität der Präparation schließen ließ (Fig. 6,7). Die Reinigungsschritte der Enzyme aus den anderen beiden Organismen zeigten ein identisches Bild. In Fig. 7 sind die homogenen Proteine aller drei Bakterien nebeneinander dargestellt. Ein Beweis, daß es sich um die Adenylatkinase-Proteinbanden handelt, konnte zusätzlich erbracht werden, indem von einem Elektrophoreselauf mit identischen Proben je ein Gel fixiert, gefärbt und entfärbt wurde (s. 2.7.1), ein zweites jedoch nicht. Das nicht fixierte und ungefärbte Gel wurde sofort in dünne Scheiben geschnitten und diese mit wenig Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) extrahiert. Die "Gelscheibenfraktionen" wurden mit Hilfe der Luciferin-Luciferase-Methode auf Enzymaktivität überprüft (s. 3.1.1). Die Adenylatkinase-Aktivität konnte auf der Höhe der Proteinbande des gefärbten anderen Gels nachgewiesen werden.

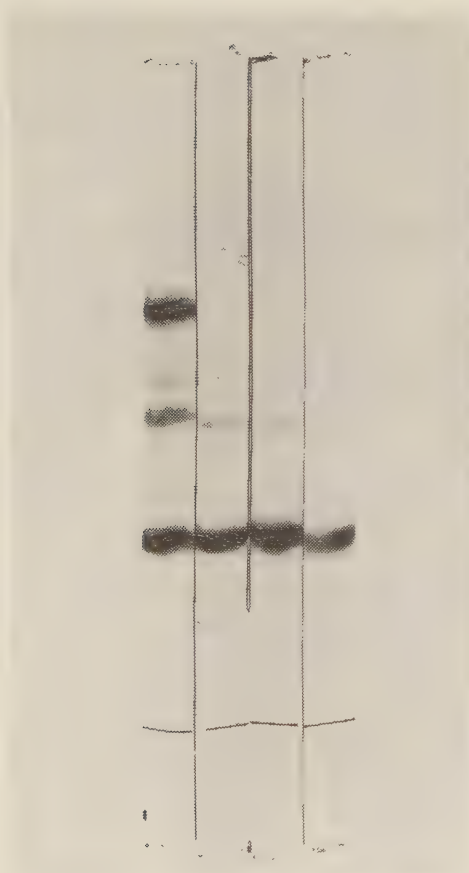


Fig. 6.1 PAGE-Röhrchengele ($T = 7 \%$), $C = 1,5 \%$, pH 8,9) der Adenylatkinase aus R. palustris. Auf die Gele wurden die verschiedenen Anreicherungsstufen aufgetragen (s. Fig. 3). Die Gele zeigen von links nach rechts: die aktiven Fraktionen der Sephacryl S 300 Säule, der präparativen IEF, der DEAE Sephadex A-50 Säule und der Sephadex G-75 Säule (homogenes Protein). Elektrophoresedauer 90 min, Stromstärke 6mA pro Gel. Die Enzyme der beiden anderen Organismen zeigten ähnliche Bandenmuster und werden deshalb nicht abgebildet.

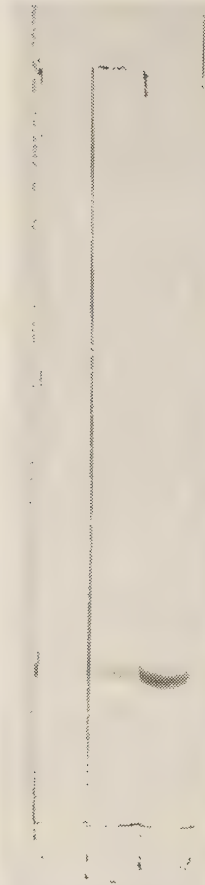


Fig. 7.: PAGE-Röhrchengele ($T = 7 \%$, $C = 1,5 \%$, $pH\ 8,9$) der homogenen Proteine aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum. Auf die Gele wurden ca. je $3\ \mu g$ Protein aufgetragen. Die Homogenität der Proben wird durch nur noch je eine sichtbare Proteinbande belegt. Elektrophoresedauer 90 min , Stromstärke 6 mA pro Gel.

3.1.3.1.2 SDS-PA Diskelektrophorese der gereinigten Enzyme

Zur Überprüfung der Reinheit der angereicherten Enzyme wurden SDS-Diskelektrophoresen auf Röhrchengelen und vertikale SDS-PAGE-Gradientengelelektrophorese auf Plattengelen (s. 2.7.1) nach dem letzten Reinigungsschritt durchgeführt. Es war jeweils nur noch eine Proteinbande sichtbar, was für die Homogenität der untersuchten Enzymproben sprach (Fig. 8).

3.1.3.2 Stabilität der Adenylatkinasen

Bezüglich der Hitze-, Kälte- und pH-Stabilität zeigten die drei untersuchten Enzyme keinen Unterschied. Optimale Aktivitätsraten wurden bei 25 °C und pH 8,0 erreicht.

3.1.3.2.1 Hitze- und Kältestabilität

Die Adenylatkinasen von R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum erwiesen sich als recht hitzelabil. Mehr als 50 % der Enzymaktivität ging verloren durch 10 Minuten Inkubieren bei 45 °C bzw. 1 Minute bei 60 °C (s. Fig. 9A). Die Kältestabilität hingegen war größer. Die gereinigten Enzyme konnten ohne Aktivitätsverlust tiefgefroren (-20 °C) für mehrere Monate aufbewahrt werden. Auch hatte wiederholtes Einfrieren und Auftauen keinen Aktivitätsverlust zur Folge. Bei 0 °C und pH 8,0 war

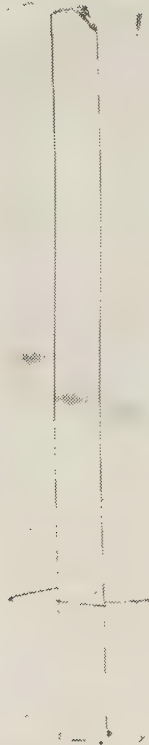


Fig. 8.: SDS-PA Diskelektrophorese auf Röhrchengelen
(T = 10 %, C = 1,5 %, SDS = 0,1 %) der homogenen Enzyme
aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum.
Aufgetragen wurden ca. 3 µg pro Gel. Elektrophoresedauer:
8 Stunden, Stromstärke 6 mA pro Gel. Von links nach rechts
sind abgebildet: R. sphaeroides-Protein, R. palustris-
Protein und R. rubrum-Protein.

eine Aufbewahrung für 7 Tage ohne Verlust von Adenylatkinase-Aktivität möglich. Die Ammoniumsulfatpräzipitate konnten 6 Monate bei 0 °C gelagert werden, wobei nur 20 % ihrer Aktivität verloren gingen.

3.1.3.2.2 pH-Wert-Stabilität

Die Adenylatkinasen der drei Bakterien zeigten eine hohe pH-Stabilität in einem Bereich von pH 6,0 - pH 10,0. Nur längere Einwirkung der extremen Werte (pH 6 bzw. pH 10) hatte einen Aktivitätsverlust zur Folge (s. Fig. 9B).

3.1.3.3 Molekulargewichtsbestimmungen der Adenylatkinasen

Durch die eingesetzten Mg-Bestimmungsmethoden wurden einerseits das Molekulargewicht der Gesamtproteine und andererseits eventuell vorhandene Untereinheiten bestimmt.

In Tab. 5 ist eine Übersicht der nach den verschiedenen Methoden ermittelten Molekulargewichte gegeben.

Molekulargewichtsbestimmung mittels HPLC

Fig. 10 stellt die Eichgerade für die Molekulargewichtsbestimmung mittels HPLC über eine TSK 3000 SW Trennsäule dar (S. 2.7.2.3).

Eluiert wurde mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0, der Elutionsfluß betrug 0,5 ml pro Minute. Das Einsetzen der

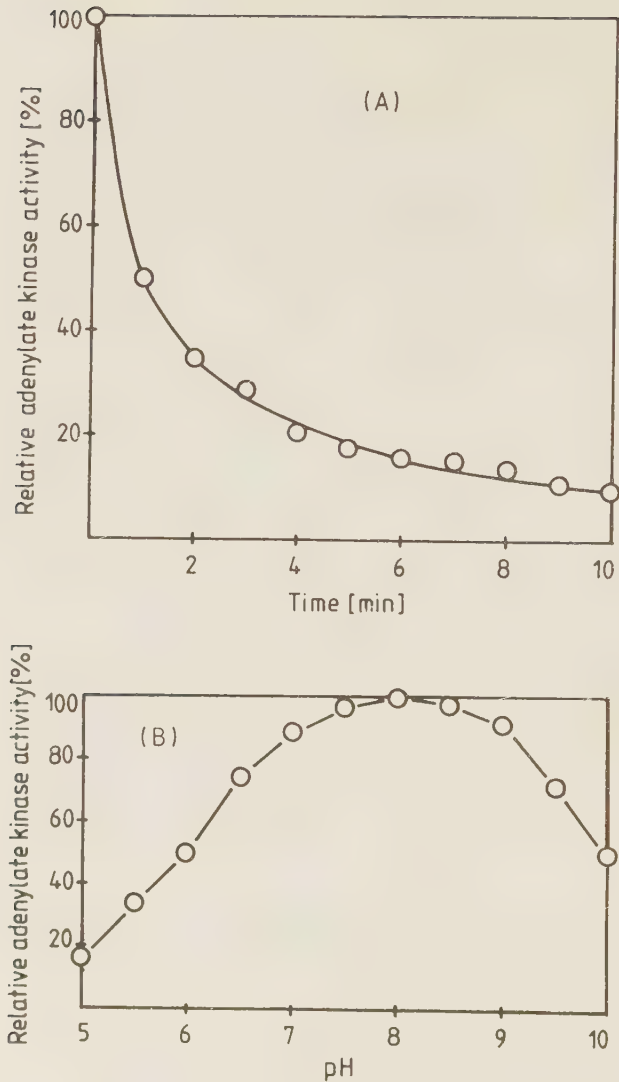


Fig. 9.: Aktivität der gereinigten Adenylatkinase aus *R. palustris* in Abhängigkeit von der Temperatur (A) bzw. vom pH-Wert (B). A: Das Enzym wurde für die angegebene Zeit auf 60 °C erhitzt und nach dem Abkühlen wurde die Adenylatkinase-Aktivität bestimmt. B: Die enzymhaltige Probe wurde auf den angegebenen pH-Wert eingestellt und die Adenylatkinase-Aktivität bestimmt.

Tab. 5.: Molekulargewichte der Adenylatkinasen, ermittelt nach den verschiedenen in Material und Methoden erläuterten Verfahren.

Methode	Organismus		
	<u>R. palustris</u>	<u>R. sphaer.</u>	<u>R. rubrum</u>
Gelchromatographie	32 500	33 500	31 000
HPLC	33 500	34 400	32 300
SDS-Elektrophorese	33 500	35 500	31 500

entsprechenden Elutionsvolumina auf der Eichkurve ergab für das R. palustris-Enzym einen Mittelwert von 33 500, für das R. sphaeroides-Enzym einen Mittelwert von 34 400 und für die Adenylatkinase aus R. rubrum einen Mittelwert von 32 300. Die Streuung der Einzelwerte betrug $\pm 8 \%$.

Die in Tab. 5 angegebenen Werte der nach den anderen Methoden bestimmten Molekulargewichte wurden aus entsprechenden Eichgeraden für diese Methoden ermittelt (s. 2.7.2.1 und 2, s. Fig. 10b,c).

3.1.3.3.1 Untereinheiten

Wie auch aus Fig. 8 ersichtlich ist, konnte bei keinem der drei Organismen ein Aufspalten der Adenylatkinase in Untereinheiten festgestellt werden.

3.1.3.4 Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Adenylatkinasen

In der zur Reinigung der Enzyme eingesetzten präparativen IEF wurde die Aktivität aller untersuchten Adenylatkinasen in einem pH-Bereich von 3,9 - 5,5 festgestellt (s. Fig. 3).

Der genaue pI-Wert der untersuchten Adenylatkinasen von R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum wurde durch Fokussierung der homogenen Enzyme in einer analytischen IEF zu 4,5 ermittelt (s. Fig. 11).

3.1.3.5 Kinetische Daten

3.1.3.5.1 Metallionenspezifität der Enzyme

Mehrere zweiwertige Kationen vermochten die Aktivität der Adenylatkinasen von R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum zu steigern. Die Reihenfolge der untersuchten Metallionen in abnehmender Aktivierungsintensität lautet: $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Zn^{2+}$. Dieses geht auch aus Tab. 6 hervor. Geringe Aktivität wurde

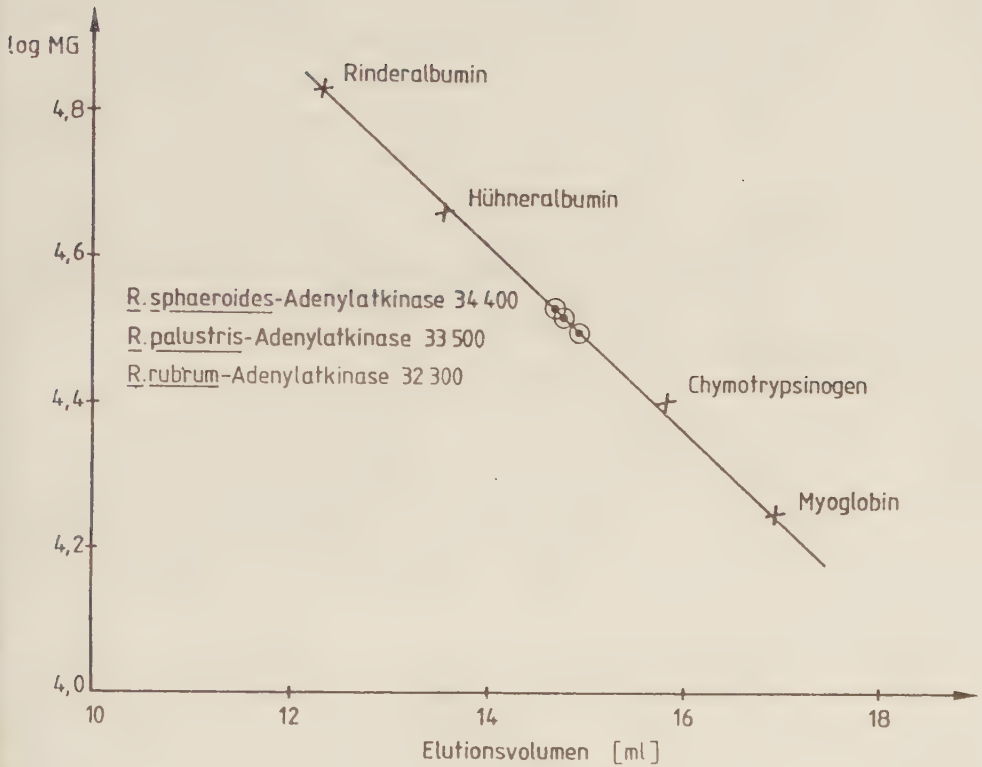


Fig. 10a: Eichgerade zur Molekulargewichtsbestimmung der Adenylatkinasen aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum mittels Hochauflösungsflüssigkeitschromatographie.

Trennsäule: Varian TSK 3000 SW, Säulenmaße: 0,9 x 60 cm, Elutionsmittel: Phosphatpuffer (0,05 M, pH 7,0), Elutionsgeschwindigkeit: 0,5 ml pro Minute.

Als Standards wurden Eichproteine aus dem MS II Kit der Firma Serva (Heidelberg) eingesetzt.

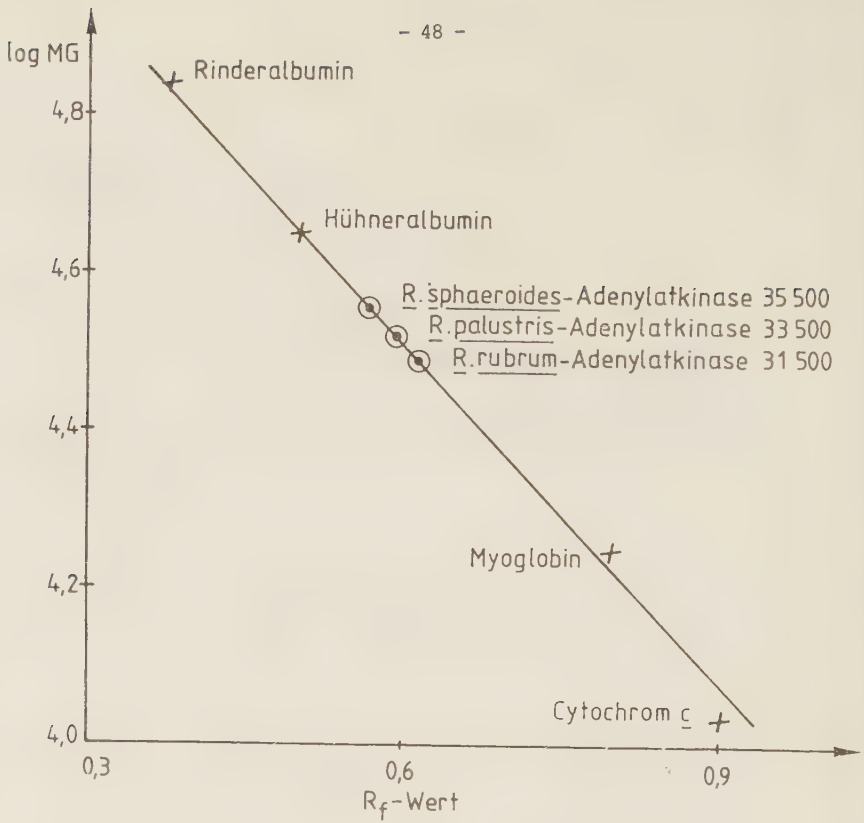


Fig. 10b: Eichgerade zur Molekulargewichtsbestimmung der Adenylatkinasen aus *R. palustris*, *R. sphaeroides* und *R. rubrum* durch SDS-Elektrophorese auf Röhrchengelen ($T=10\%$, $C=1,5\%$, $SDS=0,1\%$). Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte wie unter 2.7.1 beschrieben. Elektrophoresedauer 8 h, Stromstärke 5 mA/Gel. Eichproteine s. Fig. 10a.

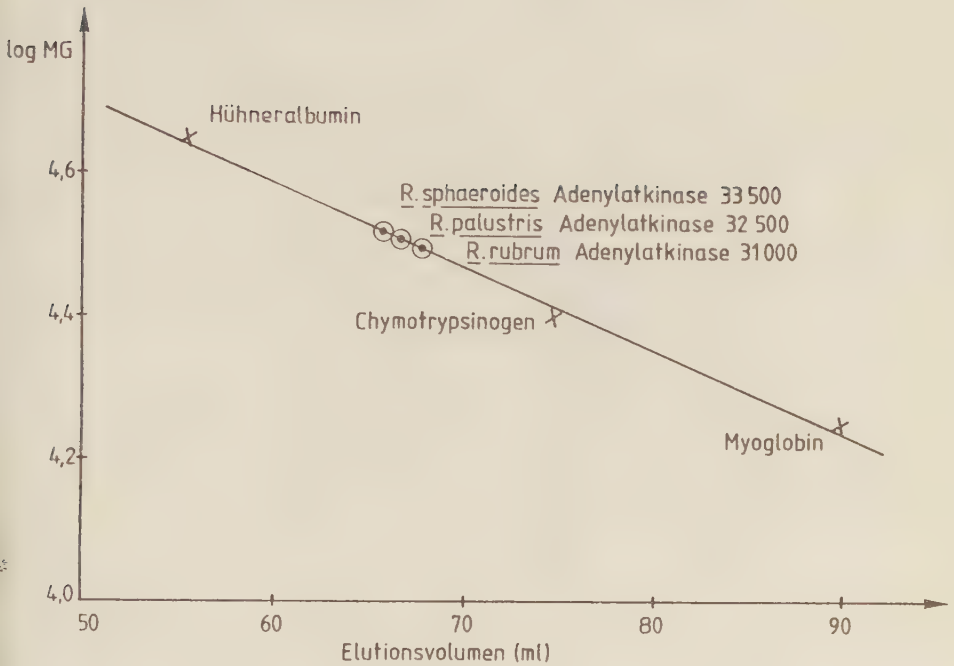


Fig. 10c: Eichgerade zur Molekulargewichtsbestimmung der Adenylatkinasen aus *R. palustris*, *R. sphaeroides* und *R. rubrum* mittels Gelpermeationschromatographie. Trenngel: Sephadex G-75, Säulenmaß: 2,5x50 cm, Elutionsmittel: Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0), Elutionsgeschwindigkeit: 8 ml/h. Eichproteine s. Fig. 10a.



Fig. 11.: Analytische IEF der homogenen Adenylatkinasen aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum.

Platte: T = 10 %, C = 1,5 %, Ampholine 4-8, Laufzeit 90 min 370-1100 V, 62-20 mA 25 W.

Aufgetragen wurden von links nach rechts: S 144 von R. palustris, homogenes R. palustris-Enzym, homogenes R. sphaeroides-Enzym, homogenes R. rubrum-Enzym und ein Eichprotein mit einem pI-Wert von 5,0 (Rinderserumalbumin).

auch mit Ba^{2+} und Fe^{2+} beobachtet. Die maximale Aktivierungsrate wurde bei einem Verhältnis von Mg^{2+} : ADP = 1 : 1 erreicht (s. Fig. 12).

Tab. 6.: Metallionenspezifität der Adenylatkinasen. Die Enzymaktivität von 0,5 μg gereinigtem Protein wurde gemessen, wie in 2.7.3.1.2 beschrieben. Die Endkonzentration der Metallchloride betrug 1 mM.

Zugesetztes Metall	Relative Aktivität in %		
	<u>R. palustris</u>	<u>R. sphaer.</u>	<u>R. rubrum</u>
Mg^{2+}	100	100	100
Ca^{2+}	73	75	72
Co^{2+}	68	68	66
Mn^{2+}	51	52	51
Zn^{2+}	45	47	43
Ba^{2+}	8	6	6
Fe^{2+}	3	4	4

3.1.3.5.2 Michaelis-Konstanten

Der K_m -Wert für ADP in Gegenwart von 1 mM MgCl_2 wurde nach 2.7.3.2 bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen und aus einem Lineweaver-Burk-Diagramm bestimmt (Fig. 13, 14, 15). Für das R. palustris-Enzym ergab sich ein K_m -Wert von 0,26 mM, für R. sphaeroides von 0,27 mM und für R. rubrum ein K_m -Wert von 0,24 mM.

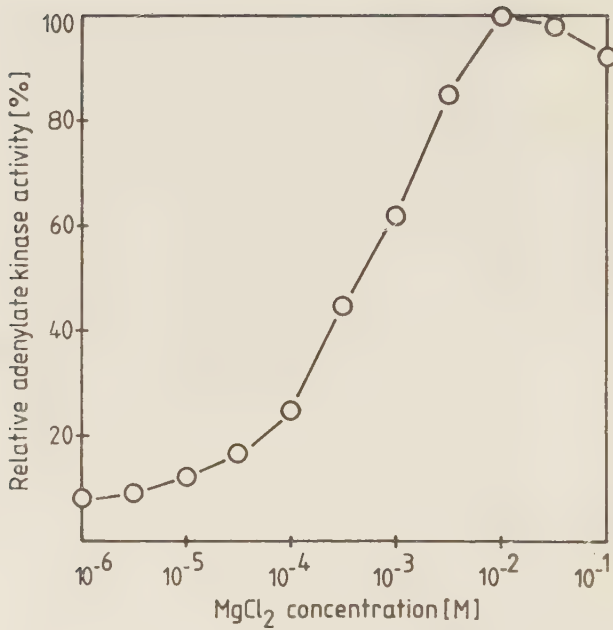


Fig. 12.: Bestimmung des Einflusses unterschiedlicher $MgCl_2$ -Konzentrationen auf die Adenylatkinase-Aktivität des Enzyms aus R. palustris.

Die entsprechenden Ansätze wurden mit den angegebenen Mengen $MgCl_2$ versetzt und dann wurde, wie unter 2.7.3.1.2 beschrieben, die Adenylatkinase-Aktivität bestimmt. Ähnliche Werte wurden für die Enzyme aus R. sphaeroides und R. rubrum gefunden. Auf eine Darstellung wurde verzichtet.

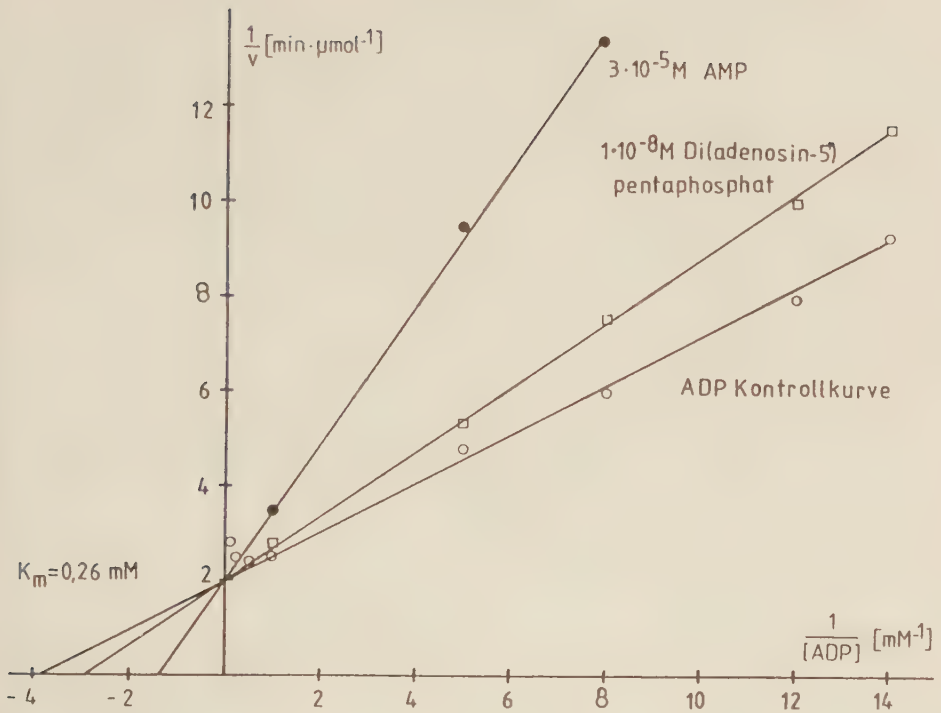


Fig. 13.: Lineweaver-Burk-Diagramm für die *R. palustris*-Adenylatkinase zur Ermittlung des K_m (ADP)-Wertes mit kompetitiver Hemmung durch AMP (3×10^{-5} M) und durch Di(adenosin-5') pentaphosphat (10^{-8} M).

Die kompetitive Hemmung drückt sich in dem gemeinsamen Schnittpunkt der Geraden mit der $1/v$ -Ordinate aus. Gemessen wurde die Adenyltakinase-Aktivität, wie in 2.7.3.1.2 beschrieben, unter Zusatz der im Diagramm angegebenen Substratkonzentrationen und 1 mM $MgCl_2$.

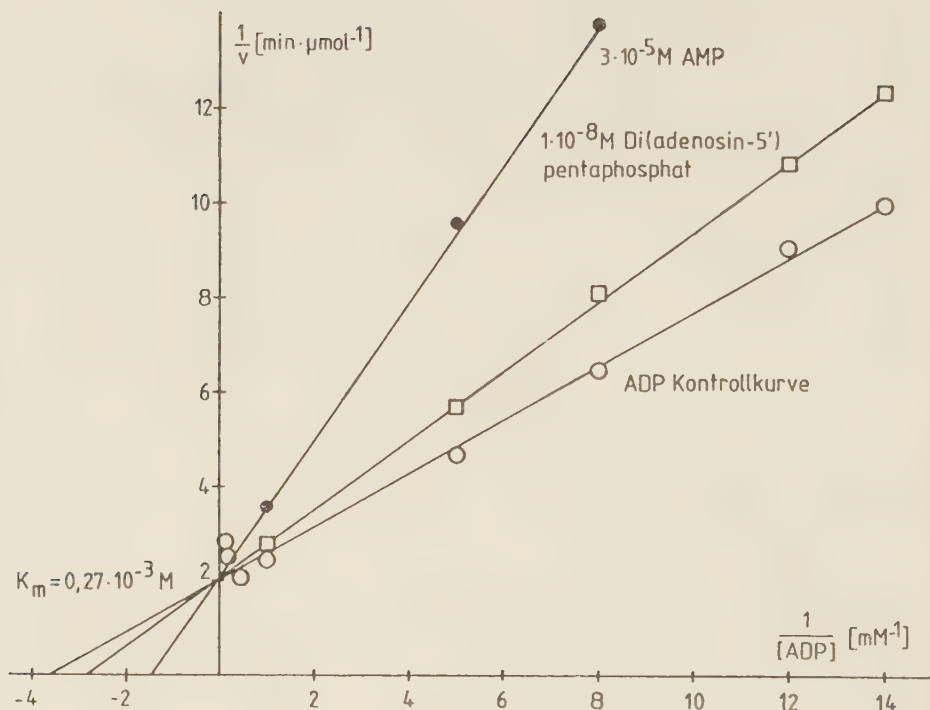


Fig. 14.: Lineweaver-Burk-Diagramm für die *R. sphaeroides*-Adenylatkinase zur Ermittlung des $K_m(\text{ADP})$ -Wertes mit kompetitiver Hemmung durch AMP ($3 \times 10^{-5} \text{ M}$) und durch Di(adenosin-5')pentaphosphat (10^{-8} M).

Die kompetitive Hemmung drückt sich in dem gemeinsamen Schnittpunkt der Geraden mit der $1/v$ -Ordinate aus. Gemessen wurde die Adenylatkinase-Aktivität, wie in 2.7.3.1.2 beschrieben, unter Zusatz der im Diagramm angegebenen Substratkonzentrationen und 1 mM MgCl_2 .

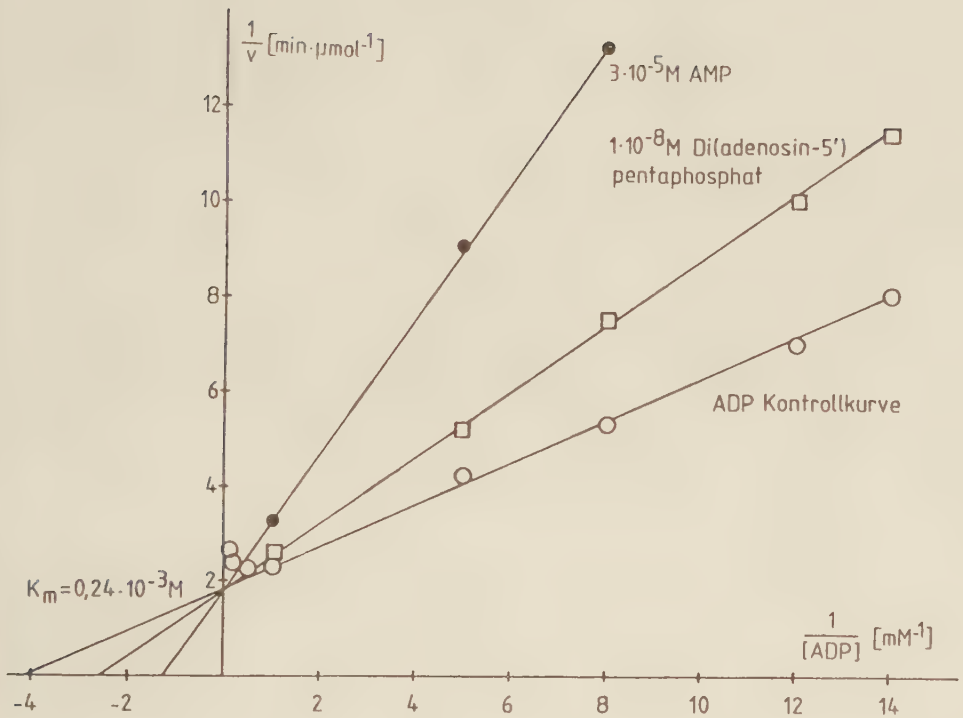


Fig. 15.: Lineweaver-Burk-Diagramm für die *R. rubrum*-Adenylatkinase zur Ermittlung des K_m (ADP)-Wertes mit kompetitiver Hemmung durch AMP (3×10^{-5} M) und durch Di(adenosin-5')pentaphosphat (10^{-8} M).

Die kompetitive Hemmung drückt sich in dem gemeinsamen Schnittpunkt der Geraden mit der $1/v$ -Ordinate aus. Gemessen wurde die Adenylatkinase-Aktivität, wie in 2.7.3.1.2 beschrieben, unter Zusatz der im Diagramm angegebenen Substratkonzentrationen und 1 mM $MgCl_2$.

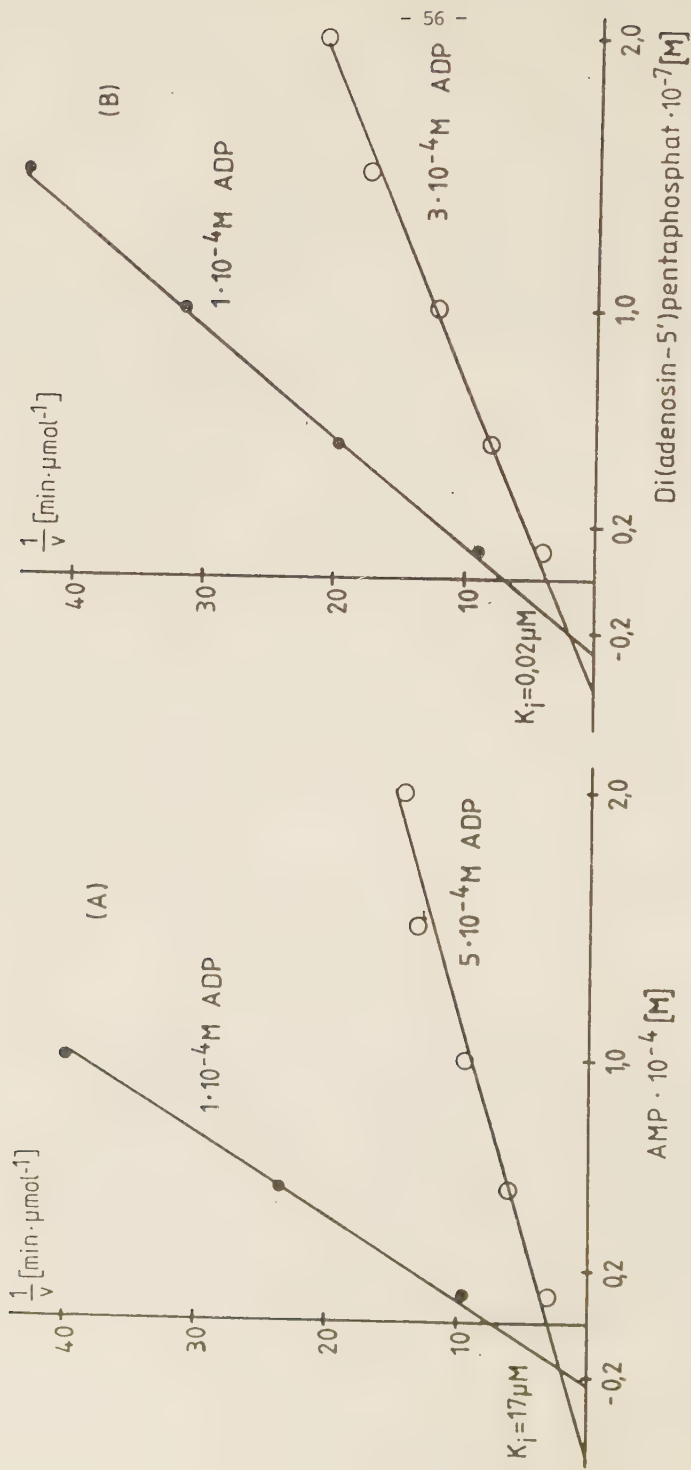


Fig. 16.: Dixon-Diagramm der *R. palustris*-Adenylatkinase zur Ermittlung der K_i (AMP) - bzw. K_i (AP_5A)-Werte für die kompetitive Hemmung durch AMP bzw. Di(adenosin-5')pentaphosphat. Die ADP-Konzentrator. ist an den Geraden angegeben. Die Adenylatkinase-Aktivität wurde, wie in 2.7.3.1.2 angegeben, gemessen. Den einzelnen Ansätzen wurden vor der Bestimmung die entsprechenden Mengen an AMP bzw. AP_5A zugesetzt.

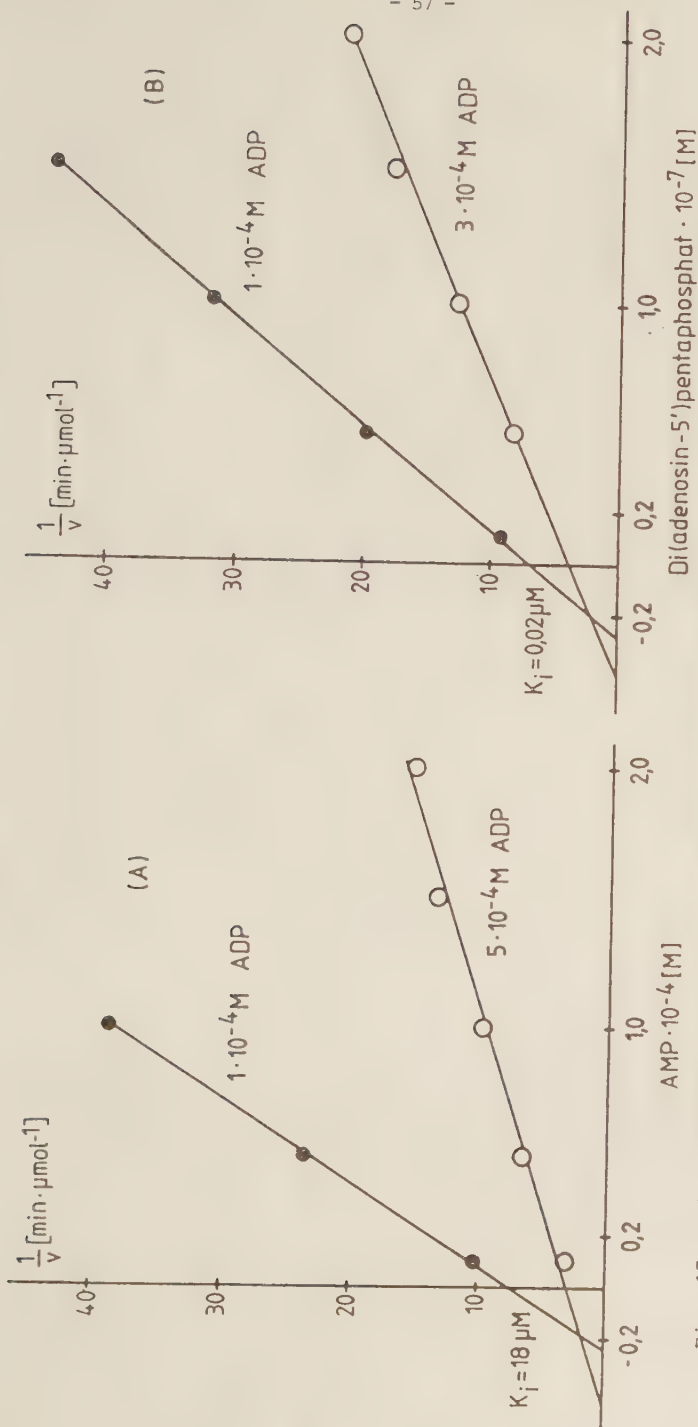


Fig. 17.: Dixon-Diagramm der *R. sphaeroides*-Adenylatkinase zur Ermittlung der $K_i(\text{AMP})$ - bzw. $K_i(\text{AP}_5\text{A})$ -Werte für die kompetitive Hemmung durch AMP bzw. Di(adenosin-5')pentaphosphat. Die ADP-Konzentration ist an den Geraden angegeben. Die Adenylatkinase-Aktivität wurde, wie in 2.7.3.1.2 angegeben, gemessen. Den einzelnen Ansätzen wurden vor der Bestimmung die entsprechenden Mengen an AMP bzw. AP_5A zugesetzt.

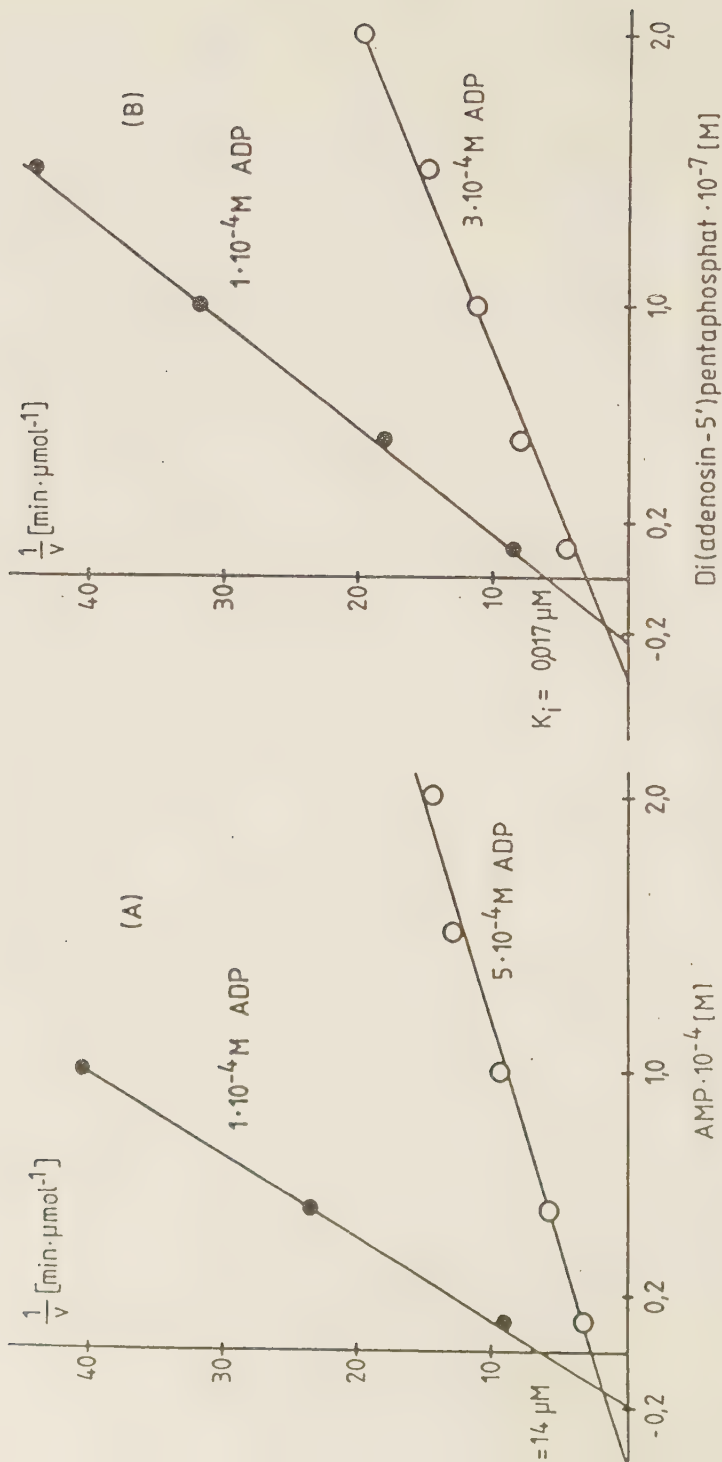


Fig. 18.: Dixon-Diagramm der *R. rubrum*-Adenylatkinase zur Ermittlung der K_i (AMP) - bzw. K_i (AP_{5A}) - Werte für die kompetitive Hemmung durch AMP bzw. Di(adenosin-5')pentaphosphat. Die ADP-Konzentration ist an den Geraden angegeben. Die Adenylatkinase-Aktivität wurde, wie in 2.7.3.1.2 angegeben, gemessen. Den einzelnen Ansätzen wurden vor der Bestimmung die entsprechenden Mengen an AMP bzw. AP_{5A} zugesetzt.

Die Substrathemmung mit freiem ADP war bei den Adenylatkinasen stark ausgeprägt. Für die Enzyme der drei Organismen wurden K_i (ADP)-Werte von 0,32 mM für R. palustris und R. sphaeroides und ein K_i -(ADP)-Wert von 0,34 mM für R. rubrum gefunden.

AMP war ein Produktinhibitor der Adenylatkinasen. Aus den Fig. 13, 14, 15 geht hervor, daß die Hemmung kompetitiv zu ADP ist. Mittels Dixon-Diagrammen (Fig. 16, 17, 18) wurde für R. palustris ein K_i -(AMP)-Wert von 17 μ M, für R. sphaeroides ein K_i -(AMP)-Wert von 18 μ M und für R. rubrum ein K_i -(AMP)-Wert von 14 μ M bestimmt.

P^1, P^5 -Di(adenosin-5')pentaphosphat (AP_5A) wird als ein starker Inhibitor der Adenylatkinase-Reaktion beschrieben (Lienhard und Secemski 1973). Für die Adenylatkinasen von R. palustris und R. sphaeroides ergab sich aus dem Dixon-Diagramm ein K_i -Wert von 0,02 μ M, für R. rubrum ein K_i -Wert von 0,017 μ M (Fig. 16B, 17B, 18B).

Die Hemmung war wie bei AMP kompetitiv zu ADP.

Sulphydrylreagentien wie p-Chlormercuribenzoat oder Jodessigsäure zeigten keinen hemmenden Einfluß auf die Adenylatkinasen der drei Organismen. Auch nach 30 Minuten Inkubationszeit mit diesen Reagenzien war keine signifikante Hemmung feststellbar. Durch Fluoridionen in einer Konzentration von 0,07 M wurden alle drei untersuchten Adenylatkinasen zu 50 % und durch eine Konzentration von 0,3 M total gehemmt.

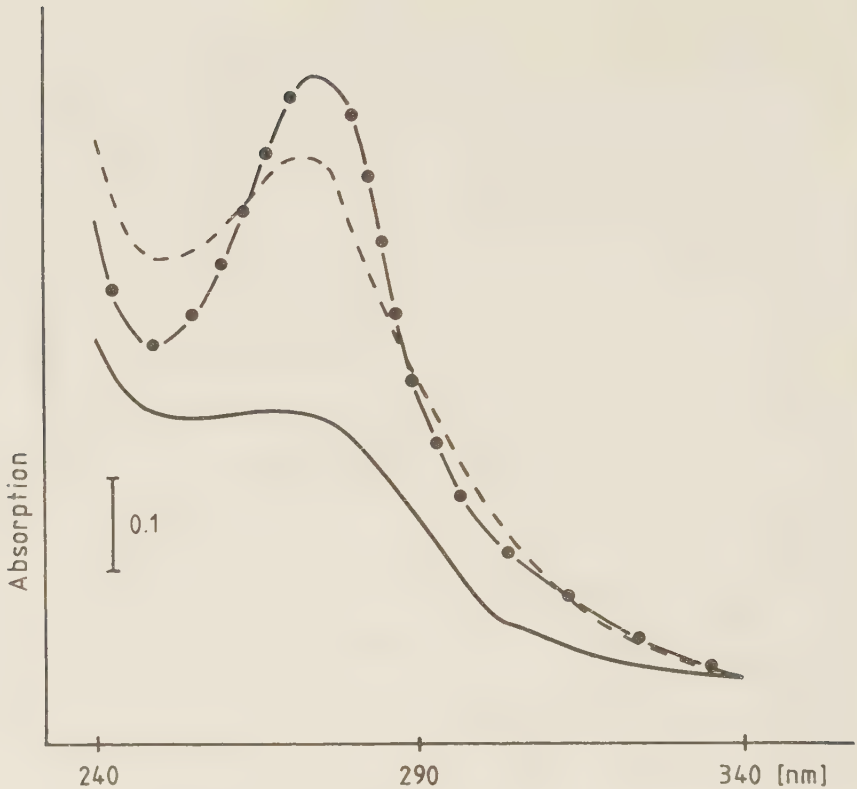


Fig. 19.: Absorptionsspektren der homogenen Adenylatkinasen aus *R. palustris*, *R. sphaeroides* und *R. rubrum*. Die Probenlösungen enthielten ca. 80 µg Protein pro ml, gemessen wurde gegen einen Pufferblindwert bei Raumtemperatur und 2 nm Spaltbreite mit einem Shimadzu UV 210 A Spektralphotometer.

---○--- *R. palustris*-Enzym, ---●--- *R. sphaeroides*-Enzym,
— *R. rubrum*-Enzym.

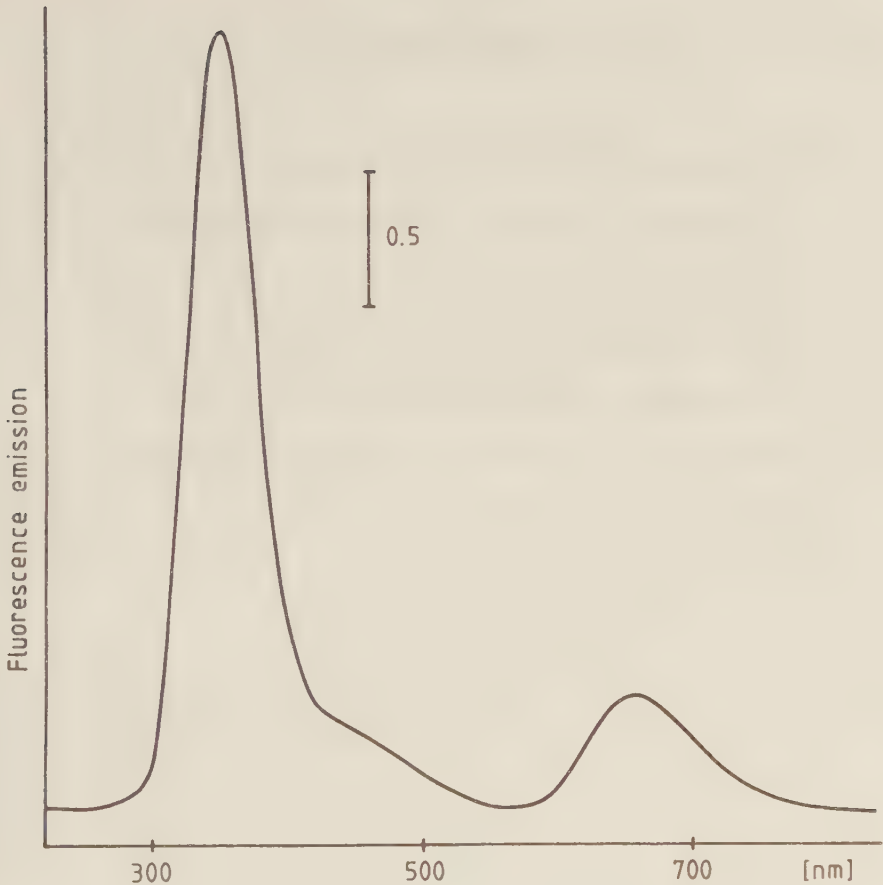


Fig. 20.: Fluoreszenzemissionsspektrum der homogenen *R. palustris*-Adenylatkinase.

Aufgenommen wurde das Spektrum bei 5 nm Spaltbreite und einer Anregungswellenlänge von 283 nm, in Quarzküvetten (1 cm) bei Raumtemperatur. Die Probelösung enthielt ca. 80 µg Protein pro ml. Die durch die Anregungswellenlänge bedingten Maxima bei 283 bzw. 546 nm sind in der Darstellung nicht berücksichtigt.

R. sphaeroides- und *R. rubrum*-Enzym ergaben ähnliche Spektren. Auf eine Darstellung wurde deshalb verzichtet.

3.1.3.6 Spektren der untersuchten Enzyme

Die von den untersuchten Enzymen aufgenommenen Absorptionsspektren stimmten mit den von Noda und Kuby (1957b) und Callaghan und Weber (1959) aufgenommenen Absorptionsspektren der Adenylatkinase aus Kaninchenmuskel überein. Ein Tal bei 250 nm und ein Maximum bei ca. 270 nm wurde bei allen spektralphotometrisch untersuchten Adenylatkinasen gefunden (s. Fig. 19). Fig. 20 zeigt das Fluoreszenzspektrum der homogenen R. palustris-Adenylatkinase.

3.2 Die Bakteriochlorophyllbestimmung im wässrigen Medium
bei 375 nm

Um die Zweckmäßigkeit und Qualität der in dieser Arbeit beschriebenen Methode zu untersuchen, wurden sowohl mit dieser Methode als auch mit den zum Vergleich herangezogenen BChl-Bestimmungen umfangreiche Versuchsreihen unternommen und vergleichende Messungen durchgeführt. Die BChl-Bestimmungen gliedern sich in Methoden, die direkt (1) in wässrigen Medien durchgeführt werden und (2) in Extraktionsmethoden.

Bei den direkten Meßmethoden werden die Präparationen in Puffer gemessen, d.h. ohne das Bakteriochlorophyll mit organischen Reagenzien vor der Messung aus seinen physiologischen Bindungen herauszulösen. Direkte Bestimmungsmethoden sind die Methode nach Clayton (1963b) mit Messung bei 880 nm und die Methode nach Sojka et al. (1970), eine weitere, die hier ausgearbeitete.

Bei den Extraktionsmethoden wird das BChl möglichst quantitativ mit organischen Lösungsmitteln aus der zu untersuchenden Präparation extrahiert und im Extraktionsmittel photometrisch die Absorption bestimmt.

Hierbei wird die Struktur des Bakteriochlorophyll-Protein-Komplexes zerstört und unter anderem das Absorptionsverhalten der Bakteriochlorophylle verändert (s. Fig. 21 - 24).



Fig. 21.: Spektren der Chromatophorpräparationen aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum. Die Chromatophorpräparationen wurden hergestellt, wie unter 2.7.7.1 beschrieben, alle auf den gleichen BChl-Gehalt eingestellt und im Photometer gegen einen Pufferblindwert die Absorptionsspektren aufgenommen.
 — R. rubrum-Spektrum, - - - R. palustris-Spektrum,
 | • • • | R. sphaeroides-Spektrum.

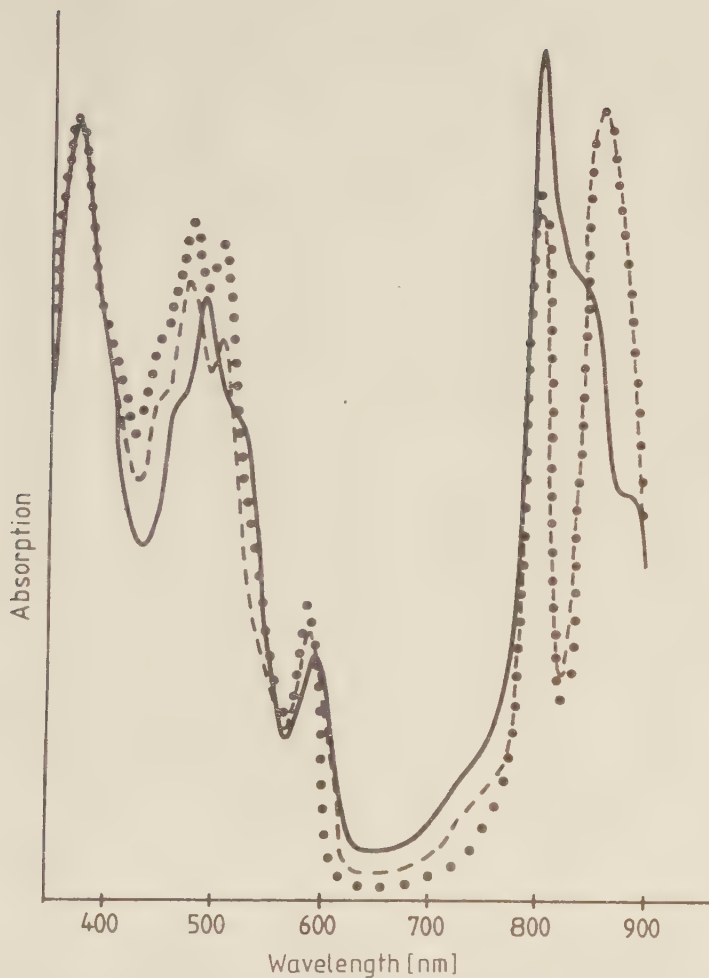


Fig. 22.: Spektren der Chromatophorpräparationen aus *C. vinosum*, *R. acidophila* und *R. capsulata* in wässrigen Lösungen.

Die Chromatophorpräparationen wurden hergestellt, wie unter 2.7.7.1 beschrieben, alle auf den gleichen BChl-Gehalt eingestellt und ihre Spektren aufgenommen.

— *C. vinosum*-Spektrum, - - - *R. acidophila*-Spektrum,
| • • • | *R. capsulata*-Spektrum.

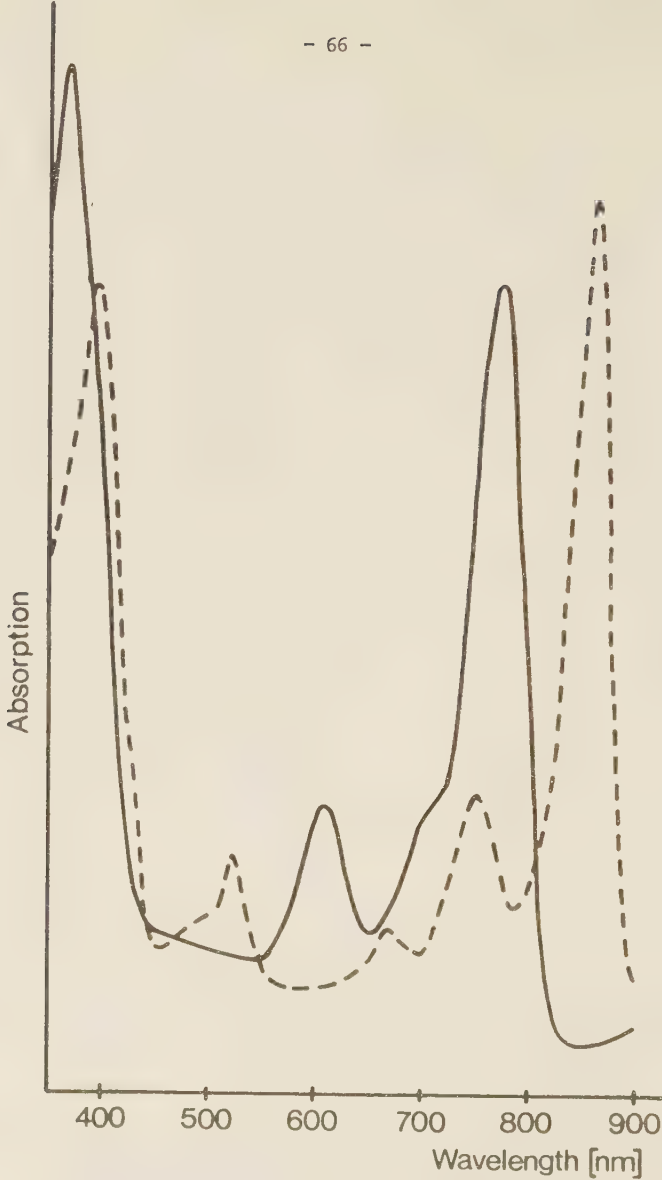


Fig. 23.: Spektren von BChl bzw. Bakteriopheophytin in Methanol. Die Präparation wurde, wie in 2.7.7.2 beschrieben, extrahiert und dann durch Zugabe von Tetrachlorkohlenstoff/HCl in Bakteriopheophytin überführt. — BChl in Methanol, - - - Bakteriopheophytin in Methanol/Tetrachlorkohlenstoff/HCl-Gemisch gegen entsprechende Blindwerte.

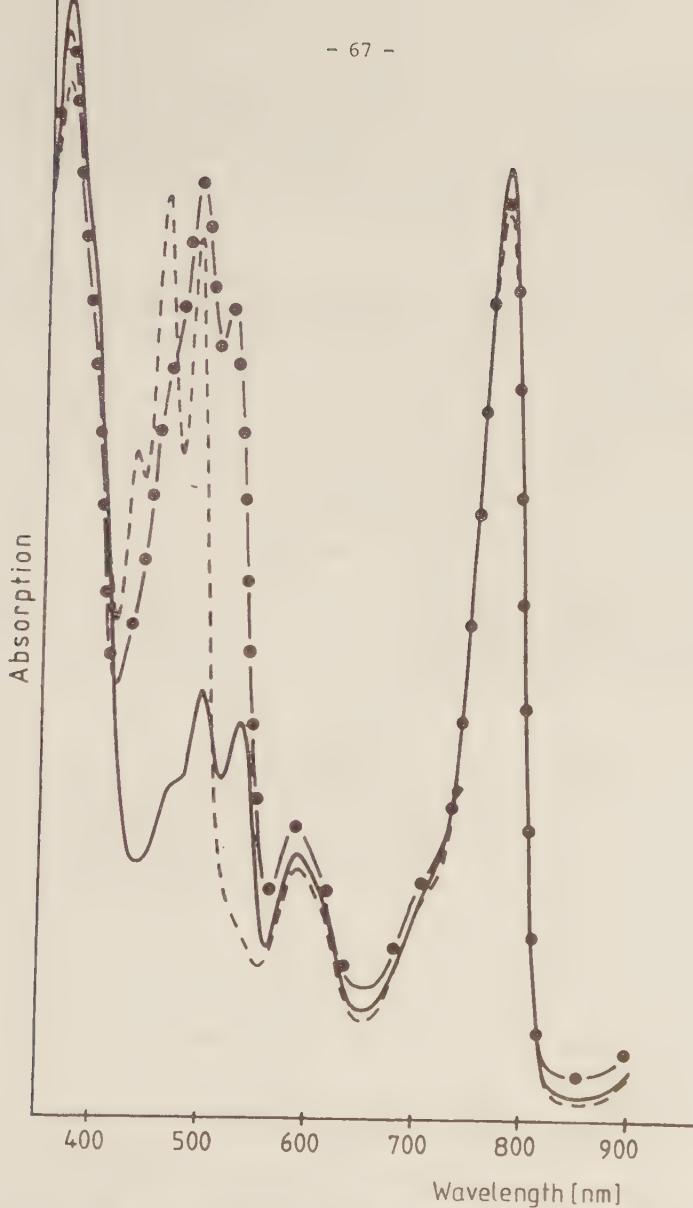


Fig. 24.: Spektren der Extrakte nach Clayton mit Aceton/
Methanol aus R. palustris-, R. sphaeroides- und R. rubrum-
Chromatophoren. Die Präparationen wurden extrahiert, wie
unter 2.7.7.5 beschrieben. Die Spektren der Extrakte wur-
den gegen einen entsprechenden Blindwert gemessen.
— R. rubrum-Extrakt, - - - R. sphaeroides Extrakt,
••• R. palustris-Extrakt.

3.2.1 Bestimmung der millimolaren Extinktionskoeffizienten
bei 375 nm in Puffer für die Purpurbakterien *C. vinosum*,
R. acidophila, *R. capsulata*, *R. palustris*, *R. sphaeroides*
und *R. rubrum*

Um quantitative BChl-Bestimmungen über photometrische Messungen machen zu können, muß der für jede Methode spezifische mM Extinktionskoeffizient bekannt sein. Mit diesem läßt sich dann nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die BChl-Konzentration berechnen.

Bei Extraktionsmethoden gibt es für jede Methode nur je einen mM Extinktionskoeffizienten, da das BChl aus verschiedenen Organismen nach Überführung in organisches Lösungsmittel identisches Absorptionsverhalten zeigt.

Bei Bestimmungsmethoden in wässrigen Medien muß für jeden Organismus, der untersucht werden soll, ein eigener mM Extinktionskoeffizient ermittelt werden, da die Absorptionsspektren der Bakteriochlorophylle in ihren physiologischen Strukturproteinkomplexen unterschiedlich sind (Schlegel und Pfennig 1961, Biebl und Drews 1969, Fig. 21, 22). Die mM Extinktionskoeffizienten bei 375 nm wurden für alle untersuchten Organismen durch direkten Vergleich mit Extraktionsmethoden bestimmt.

Die endgültigen Werte wurden für jeden Organismus mittels 10 Meßreihen aus 10 verschiedenen Kulturansätzen errechnet. Für jeden Ansatz wurde hierzu die Absorption nach den in 2.7.7 beschriebenen Methoden ermittelt. Bei den angegebenen Vergleichsmethoden konnte mit Hilfe des bekannten mM Extinktionskoeffizienten der Gehalt an BChl in µg oder µMol berechnet werden.

Der Wert des gesuchten mM Extinktionskoeffizienten ergab sich daraus dann nach folgender Gleichung (1 cm Lichtweg):

$$\text{Gl. A: } \epsilon_{375} = \frac{\text{Absorption bei 375 nm}}{\text{mMol BChl pro Liter, bestimmt nach der Referenzmethode}}$$

Legt man die so ermittelten mM Extinktionskoeffizienten zugrunde, ergibt sich der BChl-Gehalt der Probe, berechnet als Bakteriochlorophyll a, in $\mu\text{g/ml}$ aus folgender Gleichung (1 cm Lichtweg):

$$\text{Gl. B: } \mu\text{g BChl/ml Probe} = \frac{\text{Absorption bei 375 nm} \times \text{Molekulargewicht BChl } \underline{a(911,5)}}{\text{mM Extinktionskoeffizient bei 375 nm}}$$

Die mM Extinktionskoeffizienten für die Messung in Puffer bei 375 nm der Bakterien C. vinosum, R. acidophila, R. capsulata, R. palustris und R. sphaeroides wurden alle zu $100 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bestimmt, der für R. rubrum zu $110 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Die statistische Auswertung aller 10 durchgeführten Meßreihen ergab folgende Werte:

die Standardabweichung (berechnet nach $S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$) betrug für:

	Ref.1	Ref.2
A. <u>C. vinosum</u>	3,6	3,8
B. <u>R. acidophila</u>	3,9	4,3
C. <u>R. capsulata</u>	4,0	3,7
D. <u>R. palustris</u>	2,7	2,4
E. <u>R. sphaeroides</u>	3,8	3,6
F. <u>R. rubrum</u>	2,2	2,6

Besser zum Vergleich miteinander geeignet sind die Werte der relativen Standardabweichung $S_{rel} = \frac{S}{\bar{X}} 100 [\%]$.

	$S_{rel} (Ref.1)$ [%]	$S_{rel} (Ref.2)$ [%]
A.	3,5	3,8
B.	3,8	4,3
C.	4,0	3,6
D.	2,6	2,3
E.	3,7	3,5
F.	2,1	2,6

Ref.1 = Extraktion nach Clayton mit Aceton/Methanol
7/2 (772 nm, $\epsilon = 75 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Ref.2 = Extraktion nach van Niel und Arnold, Bestimmung
als Bakteriopheophytin (667,8 nm, $\epsilon = 9.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

In Tab. 7 sind die Werte einer der 10 durchgeführten
Meßreihen zur Ermittlung des mM Extinktionskoeffizienten
bei 375 nm von C. vinosum aufgeführt.

3.2.2 Linearität der untersuchten Methoden

Wie aus Fig. 25 hervorgeht, wurde Linearität in einem
Konzentrationsbereich von 5 - 20 µg BChl pro ml Probe
für die Bestimmung bei 375 nm ermittelt. Höhere Konzen-
trationen konnten problemlos nach vorhergehender Ver-
dünnung der Probe bestimmt werden.

Die Bestimmung in Puffer nach Clayton bei 880 nm ver-
lor im Bereich ab 10 µg/ml an Linearität (Fig. 25) und

Tab. 7.: Meßreihe zur Ermittlung des mM Extinktionskoeffizienten bei 375 nm für C. vinosum.

Von je drei identischen Ansätzen wurde der BChl-Gehalt nach den angegebenen Methoden bestimmt bzw. die Absorption bei 375 nm gemessen. Mit den so ermittelten Daten konnte nach Gl. A der mM Extinktionskoeffizient für die Bestimmung bei 375 nm berechnet werden.

Ref.1 = Extraktion mit Aceton/Methanol nach Clayton

Ref.2 = Extraktion nach van Niel und Arnold, Bestimmung als Bakteriopheophytin

A_{375}	mmol BChl/l (Ref. 1)	375	$x_i - \bar{x}$	mmol BChl/l (Ref. 2)	375	$x_i - \bar{x}$
0,22	$2,02 \cdot 10^{-3}$	109	8	$1,95 \cdot 10^{-3}$	107	8,6
0,44	$4,19 \cdot 10^{-3}$	105	4	$4,23 \cdot 10^{-3}$	104	5,6
0,65	$6,25 \cdot 10^{-3}$	104	3	$6,70 \cdot 10^{-3}$	97	1,4
0,83	$8,13 \cdot 10^{-3}$	102	1	$8,55 \cdot 10^{-3}$	97	1,4
1,08	$1,10 \cdot 10^{-2}$	98	3	$1,13 \cdot 10^{-2}$	95	3,4
1,31	$1,36 \cdot 10^{-2}$	96	5	$1,39 \cdot 10^{-2}$	94	4,4
1,52	$1,53 \cdot 10^{-2}$	99	2	$1,55 \cdot 10^{-2}$	98	0,4
1,75	$1,75 \cdot 10^{-2}$	100	1	$1,80 \cdot 10^{-2}$	97	1,4
1,95	$1,98 \cdot 10^{-2}$	98	3	$1,98 \cdot 10^{-2}$	98	0,4
2,16	$2,20 \cdot 10^{-2}$	98	3	$2,20 \cdot 10^{-2}$	98	0,4
$\bar{x} = 101$				$\bar{x} = 98,4$		

Die statistische Auswertung dieser Meßreihe ergab ein S_{rel} (Ref.1) von 3,9 % und ein S_{rel} (Ref.2) von 4,0 %.

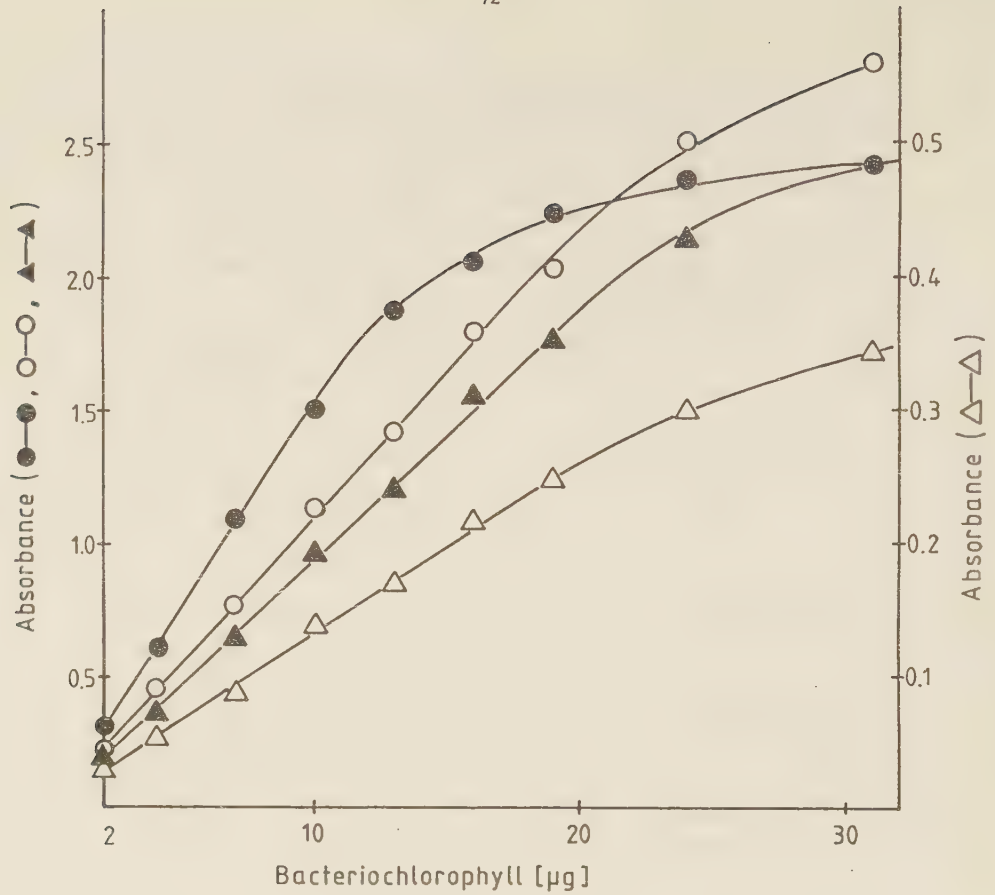


Fig. 25.: Linearität der untersuchten Methoden.

Steigende Volumina von Chromatophorpräparationen wurden gemäß den verschiedenen Methoden behandelt und gemessen.

(○—○) Bestimmung bei 375 nm in Puffer

(●—●) Bestimmung bei 880 nm in Puffer nach Clayton (1963b)

(△—△) Extraktionsmethode nach van Niel und Arnold (1938)

(▲—▲) Extraktionsmethode nach Clayton (1963a)

konnte deshalb für Konzentrationen ab 10 µg BChl pro ml Probe nur nach entsprechender Verdünnung eingesetzt werden. Die Extraktionsmethoden zeigten Linearität im Bereich von 5 - 20 µg/ml Probe (s. Fig. 25).

3.2.3 Vollständigkeit der Extraktion bei den Methoden nach Clayton, van Niel und Arnold und Smith und Benitez

Ein wesentlicher Schwachpunkt der Extraktionsmethoden wurde in der Einleitung schon kurz erwähnt. Sowohl bei der Extraktion mit Methanol als auch bei der Extraktion mit Aceton/Methanol 7/2 v/v war keine vollständige Überführung des BChl in die organische Phase mit nur einer Extraktion durchführbar. Durch mehrmalige Behandlung derselben Probe mit dem organischen Lösungsmittel und Bestimmung des BChl-Gehaltes der einzelnen Extrakte wurde festgestellt, daß mit der ersten Extraktion, je nach Konzentration der Probe, zwischen 80 und 95 % des Gesamtbakteriochlorophyllgehaltes erfaßt werden konnten.

3.2.4 Störanfälligkeit der Methoden

Außer den in 3.2.3 aufgezeigten Unzulänglichkeiten waren noch weitere Störfaktoren bei den verschiedenen Methoden zu beachten.

Wie eingangs erwähnt, wird das BChl durch die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln aus seinen natürlichen Bindungen gelöst und dadurch sehr instabil. Die Licht-

und Oxidationsempfindlichkeit des extrahierten BChl ist schon von anderen Autoren beschrieben worden (Smith und Benitez 1955; Sojka et al. 1970). Dies wirkte sich auch auf die Bestimmung des BChl-Gehaltes nach Extraktion erheblich aus. Fig. 26 gibt die Abnahme der Extinktionswerte in Abhängigkeit von der Lichteinwirkung auf die Extraktionslösungen wieder. Die Messungen wurden durchgeführt, indem in Intervallen von einer Minute die Abnahme der Extinktion photometrisch bestimmt wurde.

Bei der Extraktion mit Methanol war dieser Einfluß besonders ausgeprägt. Nach 4 Minuten Tageslichteinfluß (2400 Lux) war die Absorption um 50 % gesunken und damit auch der daraus zu ermittelnde BChl-Gehalt. Mit der Überführung des extrahierten BChl in das stabilere Bakteriopheophytin nach van Niel und Arnold (1938) wurde die schnelle Extinktionsabnahme durch Licht- und Luftwirkung zwar unterbrochen, die Schädigung des BChl vor der Umwandlung in das Bakteriopheophytin ließ sich dadurch nicht verhindern.

Bei der Extraktion mit Aceton/Methanol nach Clayton (1963a) betrug die Extinktionsabnahme nach 13 Minuten ca. 50 %. Durch Licht von einer Wellenlänge > 700 nm (Infrarotlicht, Dunkelkammer) wurde das extrahierte BChl nicht geschädigt, und die Extinktionswerte zeigten sich über einen längeren Zeitraum stabil (s. Fig. 26).

Die Bestimmungen in Puffer erwiesen sich als sehr stabil. Sie wurden von Licht- und Lufteinwirkung nicht beeinflusst.

und die Absorption veränderte sich während 180 Minuten nicht.

Bei den Bestimmungen im Infrarot-Bereich (880 nm), die sonst gut reproduzierbare Resultate lieferten (s. Tab. 9), mußte folgendes beachtet werden: Die Absorptionsspektren von wässrigen Präparationen können, je nach dem Alter der Kultur und nach der Art der Elektronenquelle im Kulturmedium, im infraroten Bereich differieren (Biebl und Drews 1969). Es ergeben sich in einem solchen Falle für denselben Organismus, je nach Wachstumsbedingungen, unterschiedliche mM Extinktionskoeffizienten für die Bestimmung im infraroten Messbereich.

Untersuchungen mit unter differierenden Bedingungen gewachsenen R. palustris- Präparationen bestätigen dieses (Fig. 27, Tab. 8).

Ein Einfluß auf die Absorption bei 375 nm, durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen, wurde nicht festgestellt.

Wie aus Tabelle 8 zu ersehen ist, unterscheiden sich die Maxima im langwelligen Rotlicht sowohl in der Wellenlänge als auch in der Höhe der Absorption (s. Fig. 27). Diese Tatsache hat einen wesentlichen Einfluß auf den Wert des mM Extinktionskoeffizienten im IR-Bereich.

Zwei mögliche Störungen der Messung bei 375 nm wurden ebenfalls untersucht, konnten bei den hier eingesetzten Organismen jedoch nicht festgestellt werden.

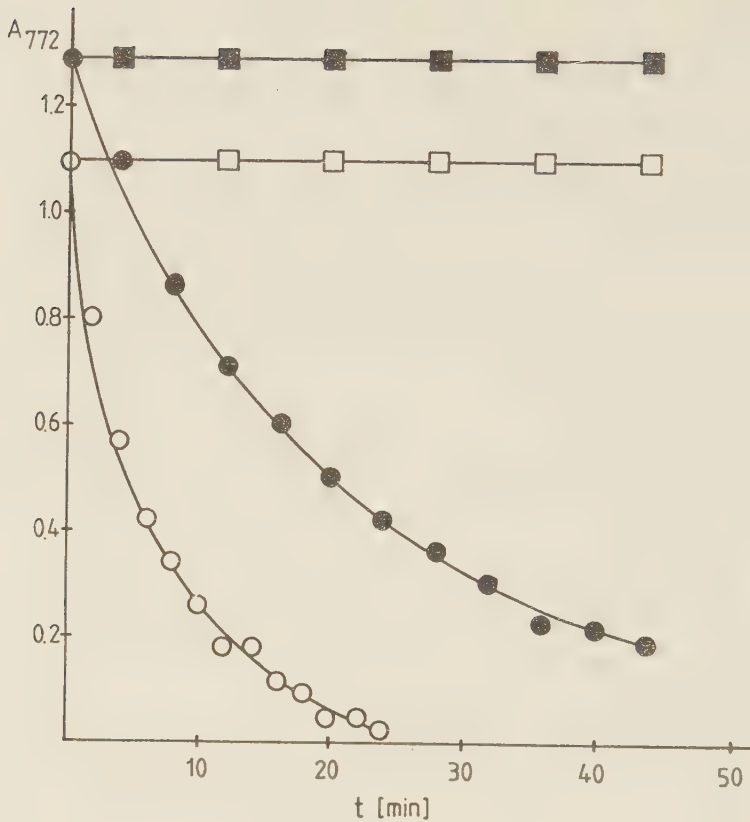


Fig. 26.: Stabilität von BChl in organischen Lösungsmitteln.

(●—●) BChl in Aceton/Methanol im Licht bzw. (■—■) im IR-Licht

(○—○) BChl in Methanol im Licht bzw. (□—□) im IR-Licht. Die Messungen wurden ausgeführt, wie im Text beschrieben.

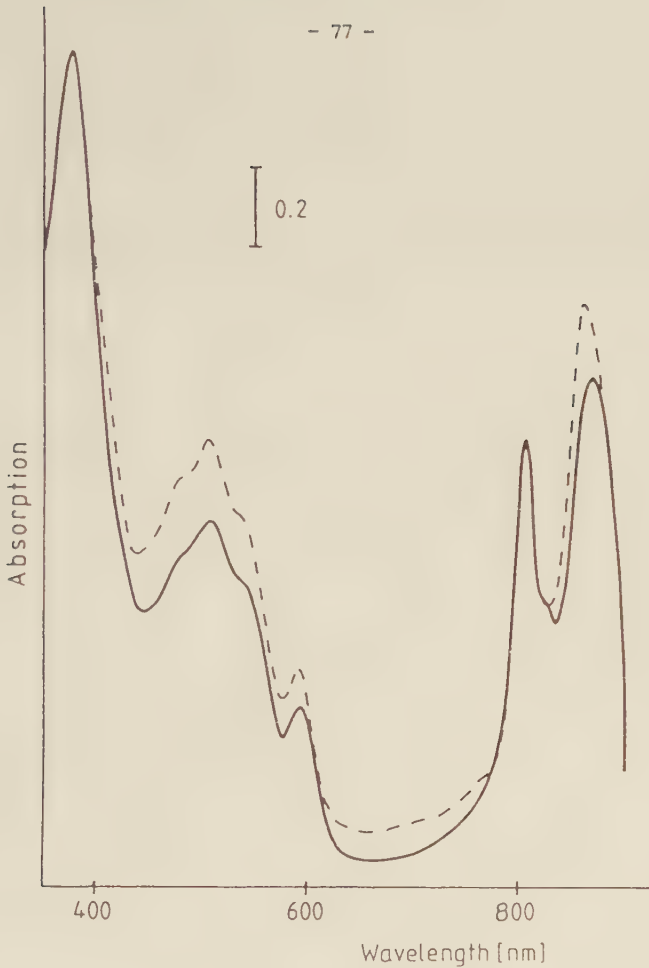


Fig. 27.: Absorptionsspektren von Chromatophoren aus *R. palustris*-Zellen auf Malat bzw. auf Thiosulfat als Elektronenquelle gewachsen.

Chromatophorpräparationen (hergestellt wie in 2.7.7.1 beschrieben) aus *R. palustris*-Zellen, die auf Malat bzw. Thiosulfat als Elektronenquelle gewachsen waren, wurden auf den gleichen Bchl-Gehalt eingestellt und Absorptionsspektren aufgenommen.

— *R. palustris*-Chromatophoren "Malat-gewachsen"

- - *R. palustris*-Chromatophoren "Thiosulfat-gewachsen"

Tab. 8.: Unterschiede der IR-Spektren von Chromatophorpräparationen in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen.

Die Chromatophorpräparationen wurden auf den gleichen BChl-Gehalt eingestellt und dann Absorptionsspektren der verschiedenen Proben aufgenommen.

Organismus (Elektronenquelle)	<u>R. palustris</u> (Malat)	<u>R. palustris</u> (Thiosulfat)
	375 (1,956)	375 (1,958)
Wellenlänge [nm] (Absorption)	805 (1,046)	805 (1,047)
	869 (1,200)	860 (1,378)

1. Einige Karotinoide absorbieren bei 375 nm und können so die Bestimmung beeinflussen. Durch dünnschichtchromatographische Auftrennung und spektralphotometrische Messung der entsprechenden Fraktionen, konnte kein Karotinoid nachgewiesen werden, das bei 375 nm absorbiert.

2. Auch einige Cytochrome absorbieren bei 375 nm, wobei die Höhe der Absorption vom Redoxzustand der Cytochrome abhängt. Bestimmungen mit durch Dithionit reduzierten bzw. durch Ammoniumpersulfat oxidierten, ansonsten identischen Ansätzen, ergaben keinen Hinweis auf einen Einfluß der Cytochrome auf die Absorption bei 375 nm.

Um eine mögliche Beeinflussung der Bestimmungen in wässrigen Medien durch unterschiedliche Puffer zu überprüfen, wurden im BChl-Gehalt identische Proben in folgenden Puffern gemessen: Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0), Glycyl-Glycin (0,02 M, pH 7,5), Histidin-HCl (0,05 M, pH 6,5), Phosphatpuffer (0,05 M, pH 7,0) und Acetatpuffer (0,05 M, pH 5,9).

Bei keinem der eingesetzten Puffer konnte eine Beeinflussung der Messungen bei 880 bzw. 375 nm festgestellt werden. Auch der pH-Wert der Ansätze hatte keinen Einfluß auf die Bestimmungen. In extremen Bereichen (pH 2 bzw. 13) wurde die Präparation geschädigt und eine Messung war wegen Trübung der Ansätze nicht mehr sinnvoll.

3.2.5 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Methoden

Aus den unter 3.2.4 beschriebenen Daten geht hervor, daß die Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethoden durch mehrere Störeinflüsse beeinträchtigt wurde.

Zur Überprüfung wurden aus einer Stamm- Chromatophor- präparation immer gleiche Volumina abpipettiert und deren BChl-Gehalt nach den verschiedenen Methoden gemessen.

Die Werte aus Tab. 9 zeigen, daß die größte Abweichung $x_{\max} - x_{\min}$ bei den Extraktionsmethoden um ca. 12 % lagen. Die Durchschnittsabweichung vom jeweiligen Mittelwert $\bar{x}$ betrug für die Methode nach van Niel und Arnold 4,3 %, für die Methode nach Clayton 3,0 %. Bei den Bestimmungen in Puffer betrug $x_{\max} - x_{\min}$ 3,9 % für 880 nm und 2,1 % für 375 nm. Die Durchschnittsabweichung vom Mittelwert betrug 0,8 % für 880 nm und 0,7 % für 375 nm.

Die relative Standardabweichung (berechnet wie unter 3.2.1) betrug für

$$S_{\text{rel}} \text{ (Methode 1)} = 2,4 \%$$

$$S_{\text{rel}} \text{ (Methode 2)} = 4,1 \%$$

$$S_{\text{rel}} \text{ (Methode 3)} = 0,96 \%$$

$$S_{\text{rel}} \text{ (Methode 4)} = 1,05 \%$$

Tab. 9.: Reproduzierbarkeit der untersuchten Methoden.
Die BChl-Bestimmungen wurden mit je 10 identischen Ansätzen nach den verschiedenen angegebenen Methoden ausgeführt. Die einzelnen Serien sind miteinander nicht vergleichbar, da von unterschiedlichen Chromatophorpräparationen ausgegangen wurde.

Methode 1 = Extraktionsmethode nach Clayton

Methode 2 = Extraktionsmethode nach van Niel & Arnold

Methode 3 = Bestimmung bei 375 nm in wässrigem Medium

Methode 4 = Bestimmung bei 880 nm in wässrigem Medium

Methode 1		Methode 2		Methode 3		Methode 4	
BChl [µg/ml]	$x_i - \bar{x}$	BChl [µg/ml]	$x_i - \bar{x}$	BChl [µg/ml]	$x_i - \bar{x}$	BChl [µg/ml]	$x_i - \bar{x}$
14.7	0.09	13.7	0.29	14.6	0.1	13.7	0.05
14.4	0.21	13.9	0.09	14.6	0.1	13.6	0.05
14.9	0.29	14.2	0.21	14.6	0.1	13.7	0.05
14.2	0.41	13.5	0.49	14.7	0.0	13.4	0.25
14.5	0.11	14.5	0.51	15.0	0.3	13.7	0.05
15.1	0.49	13.2	0.79	14.9	0.2	13.9	0.25
15.0	0.39	14.1	0.11	14.6	0.1	13.8	0.15
14.3	0.31	15.1	1.11	14.7	0.0	13.6	0.05
14.2	0.41	13.4	0.59	14.6	0.1	13.5	0.15
14.9	0.29	14.3	0.39	14.7	0.0	13.6	0.05
$\bar{x} = 14.65$		$\bar{x} = 13.99$		$\bar{x} = 14.7$		$\bar{x} = 13.65$	
$x_{\max} - x_{\min} = 0.9$		$x_{\max} - x_{\min} = 1.7$		$x_{\max} - x_{\min} = 0.3$		$x_{\max} - x_{\min} = 0.5$	

3.2.6 Bakteriochlorophyllbestimmung in ganzen Zellen in
wässrigem Medium

Die Bestimmung des BChl-Gehaltes in ganzen Zellen in wässrigem Medium ist ohne eine Beseitigung der Lichtstreuung in diesen Ansätzen nicht möglich, da eine transparente Suspension mit ganzen Zellen nicht herstellbar ist. Durch optische Korrekturen, wie den Einsatz eines Opalglasfilters (Katz und Wassink 1939) oder durch Messung der Proben in einer Suspension mit Rinderserumalbuminlösung als wässriger Phase (Barer 1955, Schlegel und Pfennig 1961, Sojka et al. 1970), läßt sich diese Schwierigkeit beheben. Mit Hilfe einer 30 %igen Rinderserumalbuminlösung als Suspendiermedium konnte bei allen untersuchten Organismen eine ausreichende Transparenz der Ansätze erzielt werden, um quantitative Bestimmungen bei 375 nm durchzuführen.

4. Diskussion

4.1 Die Adenylatkinasen aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum

In Tab. 10 sind zum besseren Überblick einige Daten von schon untersuchten Organismen mit denen der hier beschriebenen Enzyme zusammengefaßt.

Hinsichtlich der Anreicherung und der spezifischen Aktivität weisen die drei untersuchten Adenylatkinasen vergleichbare Werte mit den Daten von Enzymen aus anderen Organismen auf (200-fache Anreicherung, spezifische Aktivität von $70-80 \mu\text{Mol ATP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$).

Die Homogenität der gereinigten Adenylatkinasen wurde unter 3.1.3.1 gezeigt. Wie bei anderen zur Homogenität gereinigten Adenylatkinasen (Kaninchenmuskelenzym Noda 1958, Hefeenzym Chiu et al. 1967, E. coli-Enzym Holmes und Singer 1973 und Enzym aus Rinderherzmitochondrien Tomasselli und Noda 1980), geht aus den durchgeführten elektrophoretischen Untersuchungen hervor, daß die aktiven Enzyme von R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen, die sich nicht durch Detergenzien wie SDS in Untereinheiten aufspalten läßt. Criss et al. (1970) berichteten, daß das Rattenleberenzym aus drei Untereinheiten besteht. Dies könnte auf die Bildung eines polymeren Proteins zurückzuführen sein.

Wie aus Tab. 10 hervorgeht, gehören die untersuchten Enzyme zur Gruppe der hitzelabilen Adenylatkinasen.

Extreme Hitzestabilität (nur 20 % Aktivitätsverlust durch 10 min Erhitzen auf 100 °C in 0,1 N HCl) wurde von Colowick und Kalckar (1943) für das Kaninchenmuskelenzym berichtet. Dem entgegen steht die Instabilität des teilgereinigten Maisblatzenzyms (Hatch 1982).

Die Molekulargewichtsbestimmungen der Adenylatkinasen aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum ergaben mit allen drei eingesetzten Methoden übereinstimmende Werte (s. Tab. 5). Wie bei den anderen schon untersuchten Enzymen handelt es sich um Proteine mit relativ niedrigem Molekulargewicht (s. Tab. 10).

Der pI-Wert für alle drei untersuchten Adenylatkinasen wurde mit 4,5 bestimmt. Bezüglich dieses Kriteriums lassen sich die Adenylatkinasen in zwei Gruppen teilen: eine mit alkalischen pI-Werten und eine mit sauren pI-Werten (s. Tab. 10). Die Adenylatkinasen mit den sauren pI-Werten, zu denen auch die drei hier untersuchten gehören, sind relativ säureempfindlich (Itakura et al. 1978).

Von mehreren anderen Adenosinphosphat-umsetzenden Enzymen, wie z.B. dem Kopplungsfaktor-ATPaseprotein (Neufang et al. 1982b) oder der Kreatin-Phosphokinase (Kuby et al. 1954), ist eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Anwesenheit zweiwertiger Kationen bekannt. Auch die Enzymaktivität der Adenylatkinasen ist entscheidend abhängig von der Gegenwart der Metallionen. Die unter 3.1.3.5.1

Tab. 10.: Einige Daten von Adenylatkinasen aus verschiedenen Quellen.

Enzymquelle	MG	Anreicherung (-fach)	K_m (ADP) [mM]	Hitzeeinfluß	Einfluß von SH-Reagenz	pI-Wert	Bindungs- stellen	Referenz
Kaninchenmuskel	21 700	244	0,3	hitze stabil	hemmbar	6,1	2	Noda & Kuby 1957a,b
Rinderherz- mitochondrien	31 500	186	0,65	hitze stabil	nicht hemmbar	9,3	2	Tomasselli et al. 1980
Spinatblätter	-	100	0,13	hitze stabil	hemmbar	-	1	Murakami & Strotmann 1978
Hefe	41 000	1,56	0,3	hitze labil	nicht hemmbar	5,9	1	Chiu et al. 1967
Hefe	27 500	675	0,023	hitze labil	nicht hemmbar	5,7	2	Ito et al. 1980
Maisblätter	-	90	0,07	hitze labil	-	-	1	Hatch 1982
<u>E. coli</u>	27 000	396	0,09	hitze stabil	-	-	-	Holmes & Singer 1973
<u>Ps. denitrificans</u>	21 000	200	0,25	hitze labil	nicht hemmbar	-	-	Teraï 1974
<u>R. palustris</u>	33 500	200	0,26	hitze labil	} nicht hemmbar	4,5	1	} diese Arbeit
<u>R. sphaeroides</u>	34 400	200	0,27	hitze labil		4,5	1	
<u>R. rubrum</u>	32 100	200	0,24	hitze labil		4,5	1	

beschriebene Metallionenspezifität der drei untersuchten Enzyme stimmt bezüglich der großen Affinität zu Mg^{2+} überein mit den Daten anderer Adenylatkinasen. Die Reihenfolge weiterer zweiwertiger Kationen, geordnet nach steigender Aktivierung, war für verschiedene Organismen unterschiedlich (Su und Russel 1967, Holmes und Singer 1973). Der Effekt von Ba^{2+} und Fe^{2+} auf die hier untersuchten Enzyme mag auf Verunreinigungen der eingesetzten Salze mit Spuren anderer Metalle zurückzuführen sein (s. Tab. 6).

Über das optimale Verhältnis von ADP:Mg wurden differierende Angaben gemacht. Chiu et al. (1967) bestimmten es für das Hefeenzym zu 2,0, Holmes & Singer (1973) für das E. coli-Enzym zu 1,0 und Murakami & Strotmann (1978) zu 0,5 für das Spinatblattenzym. Die drei hier untersuchten Adenylatkinasen zeigten optimale Aktivität bei einem Verhältnis ADP:Mg von 1,0. Durch einen Mg-Überschuß wurde für die untersuchten Enzyme eine Hemmung festgestellt. Gleiches Verhalten zeigten die Enzyme aus E. coli (Holmes & Singer 1973) und das Maisblattenzym (Hatch 1982). Durch Mg-Überschuß nicht beeinflusst wurden das Hefeenzym (Su & Russel 1967) und das Spinatblattenzym (Murakami & Strotmann 1978). Trotz individueller Unterschiede zeigt sich, daß alle untersuchten Adenylatkinasen mit dem divalenten ADP-Kationenkomplex reagieren, wobei Mg^{2+} die größte Aktivitätssteigerung bewirkt und das optimale Verhältnis Mg:ADP je nach Adenylatkinase unterschiedlich sein kann.

Die K_m (ADP)-Werte der hier untersuchten Enzyme liegen in der Größenordnung der Werte anderer Adenylatkinasen (s. Tab. 10). Aus den Figuren 13-15 geht hervor, daß sich mit $1/\text{ADP}$ als Abszisse in der Lineweaver-Burk-Auftragung eine Gerade ergab. Noda (1958) erhielt bei gleicher Auftragung für Adenylatkinase aus Kaninchenmuskel eine Gerade mit $1/\text{ADP}^2$ als Abszisse, wie es nach der Reaktionsgleichung $2 \text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$ zu erwarten war. Die Linearität mit $1/\text{ADP}$ als Abszisse läßt darauf schließen, daß die Adenylatkinasen aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum nur eine Bindungsstelle für ADP aufweisen. Falls 2 Moleküle ADP gleichzeitig gebunden würden, müßte bei dieser Auftragung eine Kurve konvex zur $1/\text{ADP}$ -Ordinate entstehen, wenn man $1/v$ gegen $1/\text{ADP}$ aufträgt.

Über die Art und Anzahl der Bindungsstellen der Adenylatkinasen wurden von den verschiedenen Autoren unterschiedliche Aussagen gemacht:

Murakami und Strotmann (1978, Spinatblattenzym), Chiu (1967, Hefeenzym) und Hatch (1982, Maisblattenzym) beschrieben eine Gerade für $1/v$ gegen $1/s$ -Auftragung. Noda (1958, Kaninchenmuskelenzym) und Price et al. (1973, Schweinemuskelenzym) beschrieben zwei Bindungsstellen und erhielten eine Gerade für $1/v$ gegen $1/s^2$ -Auftragung. Bei dem Reaktionsmechanismus mit einer Bindungsstelle soll der $\text{Mg} \cdot \text{ADP}^-$ -Komplex vom Enzym als einziges Substrat umgesetzt werden (Murakami und Strotmann 1978). Bei dem

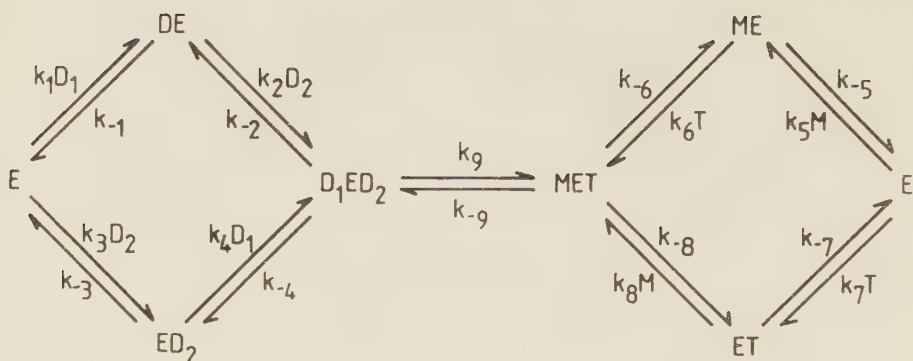


Fig. 28.: Reaktionsmechanismus der Adenylatkinase mit zwei Bindungsstellen, Random-Bi-Bi-Mechanismus, nach Rhoads und Lowenstein (1968).

E bedeutet Enzym, Buchstaben rechts von E drücken eine Chelatbindung zu E aus. M, D_1 , D_2 und T bedeuten AMP, ADP, $Mg \cdot ADP^-$ und $Mg \cdot ATP^-$.

zweibindigen Mechanismus werden zwei unabhängige Bindungsstellen für zwei verschiedene Formen von ADP, wahrscheinlich ADP und $Mg \cdot ADP^-$, angenommen (Noda 1973, Price et al. 1973).

Freies ADP bewirkt, wie in 3.1.3.5.2 beschrieben, eine Substrathemmung. Für die untersuchten Enzyme ergaben sich K_i (ADP)-Werte von 0,32 mM für R. palustris und R. sphaeroides und 0,34 mM für R. rubrum. Callaghan und Weber (1959) fanden für Kaninchenmuskeladenylatkinase einen K_i (ADP)-Wert von 1,58 mM.

Die ermittelten K_i (AMP)-Werte von 17 μM für R. palustris, 18 μM für R. sphaeroides und 14 μM für R. rubrum (s. Fig.

16, 17, 18) weisen AMP als starken Produktinhibitor der Adenylatkinase aus.

Der ermittelte K_i -Wert für den Adenylatkinase-Hemmstoff P^1 , P^5 -Di (adenosin-5') pentaphosphat von $0,02 \mu M$ für R. palustris und R. sphaeroides und $0,017 \mu M$ für R. rubrum stimmt mit dem von Lienhard und Secemski (1973) für Kaninchenmuskelenzym gefundenen K_i -Wert von $0,028 \mu M$ relativ gut überein.

Von besonderem Interesse war die Wirkung von Sulfhydrylreagenzien auf die untersuchten Enzyme. Wie in der Einleitung schon erwähnt, können die Adenylatkinasen aus tierischem Gewebe in einen sogenannten Muskel-Typ und einen sogenannten Mitochondrien- oder Leber-Typ unterteilt werden, wobei der Muskel-Typ durch Sulfhydrylreagenzien hemmbar, der Leber-Typ nicht hemmbar ist. Das Enzym aus Kaninchenmuskel enthält zwei freie Sulfhydrylgruppen und zeigte sich durch p-Chlormercuribenzoat nicht-kompetitiv hemmbar (Noda 1958). Rattenleber-Cytosolenzym (Sapico et al. 1972) und das Enzym aus Spinat-chloroplasten, welches durch $2,5 \text{ mM}$ p-Hydroxymercuribenzoat zu 60 % gehemmt wurde (Murakami und Strotmann 1978), verhielten sich genauso.

Hingegen wurden die entsprechenden Adenylatkinasen aus Rattenlebermitochondrien (Criss et al., 1970) und aus Ps. denitrificans (Terai 1974) von diesem Reagenz nicht gehemmt. Die Enzyme aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum waren auch nach längerer Inkubationszeit

weder mit p-Chlormercuribenzoat noch mit Jodessigsäure zu hemmen. Daraus läßt sich folgern, daß, wie auch bei den Hefe- und Ps. denitrificans-Adenylatkinasen, im reaktiven Zentrum der untersuchten Enzyme keine freien Sulfhydrylgruppen enthalten sind oder diese als Disulfide vorliegen. Disulfidgruppen wurden von Markland und Wadkins (1966) in der entsprechenden Rinderleber-mitochondrienadenylatkinase nachgewiesen.

Die Hemmung der Adenylatkinasen aus Kaninchenmuskel (Noda und Kuby 1957b), Rattenleber (Criss et al. 1970) und Rinderherzmitochondrien (Siekevitz und Potter 1955) durch Fluoridionen als Folge eines "Chelateffektes" wurde berichtet. Kein Fluorideinfluß konnte auf das Ps. denitrificans-Enzym (Terai 1974) gefunden werden. Die Adenylatkinasen der drei untersuchten Bakterien wurden durch 0,07 M Natriumfluorid zu 50 % und durch 0,3 M Natriumfluorid total gehemmt. Für das Kaninchenmuskelenzym wurde 50 %ige Hemmung durch 0,02 M Fluorid festgestellt (Noda und Kuby 1957b).

Intrazelluläre Verteilung der Adenylatkinasen

Über die Lokalisation der Adenylatkinasen in tierischen Zellen wurde unter 1 schon kurz berichtet. Der sogenannte Mitochondrien-Typ der Enzyme befindet sich zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran, der sogenannte Muskel-Typ im Cytosol.

Die bis heute untersuchten prokaryontischen Adenylatkinasen wurden durch Sulfhydrylreagentien nicht gehemmt

(s. Tab. 10). Watanabe und Kubo (1982) ordneten sie daher dem mitochondrialen Adenylatkinasetyp zu.

Bei den bisher untersuchten Mikroorganismen und Hefen ergab sich im einzelnen folgendes Bild: Für das Hefe-enzym wurde von Chiu et al. (1967) 90 % der Aktivität in löslichen Überstandsfractionen gefunden und 10 % in mikrosomalen und mitochondrialen Fraktionen.

Die Hefezellen wurden hierbei entweder durch enzymatische Lyse aufbereitet und dann fraktionierten Zentrifugationen unterworfen oder durch osmotischen Schock aufgebrochen und dann zentrifugiert.

Das Enzym aus Ps. denitrificans wurde von Terai (1974) nach Ultraschallbehandlung der ganzen Zellen und einmaligem Waschen der Zelltrümmer "hauptsächlich" in den vereinigten Überständen der Zentrifugationen gefunden.

Von der E. coli-Adenylatkinase wurde von Holmes und Singer (1973) die Reinigung aus dem löslichen Überstand nach Aufbrechen der Zellen durch mechanischen Druck berichtet. Über eine eventuelle Adenylatkinase-Aktivität der festen Membranfragmente wurde nichts ausgesagt.

Murakami und Strotmann (1978) berichteten über Untersuchungen einer membrangebundenen Adenylatkinase aus Spinatchchloroplasten. Sie unterschieden diese von der ebenfalls in der Präparation enthaltenen löslichen

Chloroplastenadenylatkinase. Ein Ablösen des Enzyms von der Membran gelang nicht.

Bei den drei hier untersuchten Bakterien konnten 10 % der Adenylatkinaseaktivität im Sediment P 144 nachgewiesen werden. Dies deutet daraufhin, daß die Adenylatkinasen in vivo an die Chromatophormembran assoziiert sind. Auch von anderen Arbeitsgruppen wurde eine Adenylatkinaseaktivität von zum Teil mit Detergentien behandelten Membranen gefunden (Moudrianakis und Tiefert 1976; Lundin et al. 1979).

Beim Aufbrechen der untersuchten Organismen wird vermutlich die Adenylatkinase durch die dabei auftretende mechanische oder chemische Beanspruchung von der Membran gelöst und im Überstand nachgewiesen.

Wie bei anderen membrangebundenen Enzymen (Müller et al. 1982) erwies sich die Adenylatkinase aus R. palustris schwächer an die Chromatophormembran assoziiert als die Enzyme aus R. sphaeroides und R. rubrum (s. Tab. 2).

Funktion der Adenylatkinase in den untersuchten Organismen und der zugrundeliegende Reaktionsmechanismus

Über so spezielle Funktionen der Adenylatkinase aus R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum, wie die von Hatch (1982) postulierte Funktion des Maisblatzenzyms (s. 1), läßt sich anhand der hier beschriebenen Ergebnisse nichts aussagen.

Die von Bomsel und Pradet (1968) beschriebene Regulation der Adenosinnukleotidkonzentration trifft sicher als Funktion der hier untersuchten Enzyme zu.

Überträgt man die Vermutung von Atkinson (1968), daß die Chloroplastenadenylatkinase am Energieaustausch zwischen Chloroplast und Cytoplasma beteiligt ist, auf die hier beschriebenen Systeme, stellt dies eine Erklärung für die Assoziation der Adenylatkinase an die Chromatophormembran dar. Die von Murakami und Strotmann (1978) eingehend untersuchte membrangebundene Chloroplastenadenylatkinase aus Spinatblättern bestätigt diese Vermutung.

Durch einen Vergleich der biochemischen Daten des R. rubrum Kopplungsfaktorproteins (Johansson et al. 1973) bzw. der R. palustris- und R. sphaeroides-Kopplungsfaktorproteine (Müller 1982b) mit den Daten der hier beschriebenen Adenylatkinasen konnte die Vermutung von Lundin et al. (1979) über einen Zusammenhang der Adenylatkinase-Aktivität mit dem Kopplungsfaktorprotein nicht bestätigt werden.

Betrachtet man die differierenden Aussagen über Art und Anzahl der Bindungsstellen der Adenylatkinasen (s. oben), so muß man die Feststellung von Noda (1973), daß allen Adenylatkinasen ein Random-Bi-Bi-Mechanismus (s. Fig.28) mit zwei unabhängigen Bindungsstellen gemeinsam ist und die Berichte von Murakami und Strotmann (1978) bzw. Hatch (1982) über nur eine Bindungsstelle der Enzyme unterscheiden.

Die im vorangegangenen Abschnitt berichtete, mögliche Übereinstimmung in der Funktion mit der Chloroplastenadenylatkinase wird durch die bei allen drei untersuchten Enzymen gefundene, einzelne Bindungsstelle unterstützt.

Die "biologische Einheitlichkeit" der Enzyme des Energiestoffwechsels, die von anderen Systemen bekannt und akzeptiert ist (Kopplungsfaktor-ATPase-Enzyme), wurde von Noda (1973) postuliert. Die differierenden Daten über die verschiedenen Adenylatkinasen, besonders über die Art und Anzahl ihrer Bindungsstellen und die daraus abgeleiteten Wirkungsmechanismen, lassen eine verbindliche Aussage noch nicht zu.

Zusammenhang der Struktur der Adenylatkinase mit der Taxonomie des entsprechenden Organismus

Die von verschiedenen Autoren geäußerte Meinung über den phylogenetischen Zusammenhang zwischen den Adenylatkinasen und der Taxonomie der zugehörigen Organismen (Noda, 1973; Terai, 1974; Tomasselli und Noda, 1980; Watanabe und Kubo, 1982) konnte anhand der in 3.1 beschriebenen Daten unterstützt werden. Die Adenylatkinasen von R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum sind in fast allen untersuchten Parametern nahezu identisch. In das durch die bisher beschriebenen Enzyme gebildete Schema passen die drei Adenylatkinasen gut hinein.

Wie die anderen bisher untersuchten, prokaryontischen Adenylatkinasen sind sie dem sogenannten Mitochondrien-Typ zuzuordnen (s. 1), der sich durch Sulphydrylreagenzien nicht hemmen läßt. Die Übereinstimmung in der Hitzelabilität der prokaryontischen Adenylatkinasen ist ein weiterer Hinweis auf die nahe Verwandtschaft im Vergleich zu den Enzymen aus tierischen Geweben. Die tierischen Gewebe mit dem Muskel- und dem Mitochondrien-Typ der Adenylatkinase stellen offensichtlich eine Weiterentwicklung des prokaryontischen Enzymtyps dar.

Die Erstellung eines Teiles der im vorangehenden Abschnitt diskutierten Daten wurde durch die neu entwickelte, einfache und zeitsparende quantitative BChl-Bestimmung erleichtert (Neufang et al. 1982a).

4.2 Die Bakteriochlorophyllbestimmung bei 375 nm

Eine neue BChl-Gehaltsbestimmungsmethode wurde erarbeitet und wie unter 3.2 beschrieben mit den herkömmlichen Methoden verglichen. Wichtige Gesichtspunkte bei der Entwicklung einer neuen analytischen Methode sind: die Exaktheit, die Empfindlichkeit, die Einfachheit der Durchführung und der Zeit- und Kostenaufwand. Unter diesen Aspekten werden die in 3.2 mit den verschiedenen Methoden erzielten Daten diskutiert und gewertet.

Alle untersuchten Methoden zeigen Linearität über einen Bereich von 2-20 µg BChl/ml. Der geringere Linearitätsbereich der Bestimmung in Puffer bei 880 nm (Clayton 1963b) läßt sich durch entsprechendes Verdünnen der Probe ausgleichen.

Ein Hauptproblem der Extraktionsmethoden, im Gegensatz zu den Bestimmungen in wässrigen Medien, ist die nicht quantitative Überführung des BChl in die organische Phase. Auch in niedrigen Konzentrationsbereichen ist eine 100 %ige Erfassung des BChl durch einmalige Extraktion nicht zu erreichen. Dieses Problem läßt sich lösen, indem mehrmals extrahiert wird und die vereinigten Extrakte gemessen werden. In der Laborpraxis ist ein solcher Aufwand mit 3-4 Zentrifugationen für eine Messung zu arbeitsintensiv und langwierig. Auch ist die Störung der Messung durch Lichteinwirkung so groß, daß eine exakte Bestimmung nicht erreicht würde. Die Unbestän-

digkeit der extrahierten Bakteriochlorophylle im Lösungsmittel versuchten van Niel und Arnold schon 1938 durch die Bestimmung als stabileres Bakterio-pheophytin zu umgehen. Fig. 26 macht deutlich, wie groß diese Fehlerquelle besonders bei Methanolextraktion ist. Der ermittelte Bakteriochlorophyllgehalt hängt von der Geschwindigkeit, mit der die Bestimmung durchgeführt wird, ab. Auch die Lichtintensität hat einen Einfluß.

Um mit den Extraktionsmethoden exakte Resultate zu erzielen, ist es notwendig, eine mehrmalige Extraktion im Dunkeln oder IR-Licht durchzuführen und den BChl-Gehalt aus den vereinigten Überständen zu bestimmen. Für die Routinemessung ist dieses Verfahren sicher ungeeignet.

Die Ansätze für Bestimmungen in wässrigen Medien erwiesen sich demgegenüber als von Licht- und Lufteinflüssen unabhängig und waren über mehrere Stunden stabil. Die von Biebl und Drews (1969) beschriebenen Unterschiede im infraroten Bereich des Absorptionsspektrums eines Organismus in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen konnte bestätigt werden (Fig. 27). Dies stellt eine Fehlerquelle der Messung in wässrigem Medium über den gesamten IR-Bereich dar. Eine Bestimmung des entsprechenden mM Extinktionskoeffizienten für die jeweiligen Kulturbedingungen ist unerlässlich. Wegen des damit verbundenen Arbeitsaufwandes scheint diese Be-

stimmungsmethode nur bei standardisierten Kulturbedingungen und großen Probenzahlen sinnvoll.

Durch wechselnde Wachstumsbedingungen hervorgerufene Differenzen der Absorption bei 375 nm wurden nicht gefunden.

Auch ein Einfluß der bei 375 nm absorbierenden Karotinoide auf die BChl-Bestimmung wurde bei den untersuchten Organismen nicht festgestellt.

Die Beeinflussung der Absorption bei 375 nm durch Cytochromredoxzustände war nicht nachweisbar. Der Cytochromanteil an der Gesamtabsorption bei 375 nm erwies sich als so gering, daß seine Veränderung auf die Gesamtabsorption keinen meßbaren Effekt hatte.

Bei der Reproduzierbarkeit der Bestimmungen nach den verschiedenen Methoden traten deutliche Unterschiede auf. Bei den Extraktionsmethoden zeigte sich eine maximale Abweichung der Werte voneinander um ca. 9 %.

Die statistische Auswertung der Tabelle 9 ergab eine relative Standardabweichung von 2,4 % für die Extraktion nach Clayton mit Aceton/Methanol und 4,1 % für die Extraktion nach van Niel und Arnold mit Methanol. Bei den Messungen in wässrigem Medium hing die Abweichung der einzelnen Werte voneinander (s. Tab. 9), sofern die für die Methoden nötige Transparenz der Ansätze gewährleistet war, nur noch von der manuellen Durchführung ab und lag deshalb unter 2 %. Die relative Standardabweichung wurde für die Bestimmung in Puffer bei 880 nm zu 1,05 % und für

die bei 375 nm zu 0,96 % bestimmt und wies damit nur ein Viertel der relativen Standardabweichungen der Extraktionsmethoden auf.

Die quantitative BChl-Bestimmung in ganzen Zellen ließ sich mit der Messung bei 375 nm in wässrigem Medium ebenfalls durchführen, wenn man die Lichtstreuung der Zellsuspension unterdrückte. Dies wurde erreicht, indem der Brechungsindex des Suspendiermediums demjenigen der Zellen weitmöglichst angeglichen wurde. Durch die Suspension der Zellen in einer Rinderserumalbuminlösung entsprechender Konzentration (Sojka et al. 1970, Schlegel und Pfennig 1961) wurde die Aufnahme von scharfen Absorptionsspektren ganzer Zellen möglich, und die Bestimmung des BChl-Gehaltes über das Maximum bei 375nm (Soret-Bande) konnte durchgeführt werden. Im Vergleich mit der Methode von Sojka et al. (1970), der ebenfalls eine Messung in Rinderserumalbuminlösung zugrunde liegt, ist die Bestimmung bei 375 nm einfacher und sicherer. Sojka mißt die Absorption bei 660 nm und bei 860 nm und ermittelt aus der Differenz dieser Werte den BChl-Gehalt über eine Eichkurve.

Die Bestimmung des BChl-Gehaltes in wässrigen Lösungen durch Messung bei 375 nm hat sich in der vergleichenden Betrachtung mit den herkömmlichen Methoden als die zuverlässigste und einfachste Methode erwiesen. Im Gegensatz zu den Extraktionsmethoden ist der Arbeitseinsatz bei dieser Methode sehr gering. Betrachtet man den

zeitlichen Aufwand einer Bestimmung nach den Extraktionsmethoden und dem einer Messung nach der hier beschriebenen Methode, kommt man zu einem Verhältnis von 7:1, wobei die schnellere Methode die exakteren Ergebnisse liefert.

Die Unzulänglichkeiten der Extraktionsmethoden, wie z.B. die nicht quantitative Extraktion oder die Lichtempfindlichkeit, die auch von anderen Autoren beschrieben wurden (Smith und Benitez 1955, Sojka et al. 1970), treffen bei dieser Methode nicht zu und Störungen konnten nicht festgestellt werden. Das Arbeiten in rein wässrigen Lösungen und die schnelle und einfache Durchführung läßt die Methode besonders für große Probenzahlen in Serienmessungen als geeignet erscheinen.

Die BChl-Bestimmung in Puffer bei 375 nm läßt sich auf weitere Purpurbakterien ausdehnen. Der mögliche Einfluß von Cytochromen bzw. Karotinoiden auf die Absorption bei 375 nm muß dabei berücksichtigt werden. Die Methode bringt eine Verbesserung der Ergebnisse gleichzeitig mit einer Arbeitserleichterung, Zeit- und Materialeinsparung.

5. Zusammenfassung

5.1 Die Adenylatkinasen

Die Adenylatkinasen der Purpurbakterien R. palustris, R. sphaeroides und R. rubrum konnten bis zur Homogenität aus der Überstandsfraktion S 144 angereichert werden, die Anreicherung betrug das 200-fache, die spezifische Aktivität $70-80 \mu\text{Mol ATP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Die Molekulargewichte der Enzyme wurden zu 33 500 für R. palustris, zu 34 400 für R. sphaeroides und zu 32 100 für R. rubrum ermittelt.

Eine Aufspaltung in Untereinheiten konnte durch SDS-PA-Elektrophorese nicht erreicht werden.

Die pI-Werte aller drei Enzyme wurden zu pH 4,5 bestimmt.

Zur optimalen Katalyseaktivität der Adenylatkinasen war Mg^{2+} im Verhältnis 1:1 mit ADP nötig.

Die $K_m(\text{ADP})$ -Werte in Gegenwart von 1 mM MgCl_2 wurden zu 0,26 mM für das R. palustris-Enzym, 0,27 mM für das R. sphaeroides-Enzym und zu 0,24 für das R. rubrum-Enzym bestimmt.

ADP im Überschuß war ein starker Hemmstoff. Die entsprechenden $K_i(\text{ADP})$ -Werte betrugen 0,32 mM für R. palustris und R. sphaeroides und 0,34 mM für R. rubrum.

Kompetitive Produkthemmung wurde für AMP festgestellt.

Die $K_i(\text{AMP})$ -Werte betrugen 17 μM für R. palustris, 18 μM für R. sphaeroides und 14 μM für R. rubrum.

Als weiterer kompetitiver Hemmstoff erwies sich $P^1 P^5$ -Di (adenosin-5') pentaphosphat. Die entsprechenden K_i -Werte wurden zu $0,02 \mu M$ für R. palustris und R. sphaeroides und zu $0,017 \mu M$ für R. rubrum bestimmt.

Eine Hemmung durch Sulfhydrylreagentien konnte für keines der untersuchten Enzyme festgestellt werden. Daraus ergibt sich die Abwesenheit von freien SH-Gruppen im reaktiven Zentrum der Adenylatkinasen.

Eine Assoziierung der untersuchten Enzyme mit der Chromatophormembran konnte gezeigt werden.

Es konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß der Reaktionsmechanismus über eine Bindungsstelle mit dem $Mg \cdot ADP^-$ -Komplex als Substrat abläuft.

5.2 Die Bakteriochlorophyllbestimmung bei 375 nm

Eine quantitative Bakteriochlorophyllbestimmung durch photometrische Messung in wässrigen Medien bei 375 nm wurde entwickelt.

Im Vergleich mit den herkömmlichen Methoden wurde ihre Genauigkeit, Reproduzierbarkeit, Störanfälligkeit und der nötige Arbeitsaufwand überprüft.

Die millimolaren Extinktionskoeffizienten bei 375 nm wurden für sechs Purpurbakterien bestimmt.

Die Werte betragen $\epsilon_{375} = 100 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für C. vinosum, R. acidophila, R. capsulata, R. palustris und R. sphaeroides und $\epsilon_{375} = 110 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für R. rubrum.

Die neue Bestimmung zeigte sich als die bislang schnellste und praktikabelste Methode und lieferte die exaktesten Resultate.

Nach entsprechender Behandlung der Ansätze ließ sich mit dieser Methode auch der Bakteriochlorophyllgehalt in ganzen Zellen bestimmen.

6 Literaturverzeichnis

Andrews, D.E. (1964) Biochem. J. 91, 222-233.

Atkinson, D.E. (1968) Biochemistry 7, 4030-4034.

Barer, R. (1955) Science 121, 709-715.

Biebl, H. & Drews, G. (1969) Zentrbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionkr. Hyg. Abt. 2, 123, 425-436.

Blaich, R. (1978) Stuttgart, Thieme Verlag.

Bomssel, J. & Pradet, A. (1968) Biochim. Biophys. Acta 182, 230-242.

Bose, S.K. (1963) in: Bacterial Photosynthesis (Gest, H., San Pietro, A. & Vernon, L.P., eds.) p. 501-510, Yellow Springs, The Antioch Press.

Brdiezka, D., Pette, D., Brunner, G. & Miller, F. (1968) Eur. J. Biochem. 5, 294-303.

Callaghan, O. & Weber, G. (1959) Biochem. J. 73, 473-485.

Chiu, C., Su, S. & Russel, P.J. (1967) Biochim. Biophys. Acta 132, 3260-3265.

Clayton, R.K. (1963a) Biochim. Biophys. Acta 75, 312-323.

Clayton, R.K. (1963b) in: Bacterial Photosynthesis (Gest, H., San Pietro, A. & Vernon, L.P., eds.) p. 498-501, Yellow Springs, The Antioch Press.

Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.R. & Stanier, R.Y. (1957) J. Cell. Comp. Physiol. 49, 25-68.

Colowick, S.P. & Kalckar, H.M. (1943) J. Biol. Chem. 148, 117-126.

Criss, W.E., Sapico, V. & Litwack, G. (1970) J. Biol. Chem. 245, 6346-6351.

Dixon, M. & Webb, E.C. (1979) London, Longman Group Ltd.

Fehrnrström, H. & Moberg, U. (1977) LKB Application Note 306.

Hatch, M.D. (1982) Austr. J. Plant. Physiol. 9, 287-296.

Hatch, M.D. & Kagawa, T. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 159, 842-853.

Holmes, R.K. & Singer, M.F. (1973) J. Biol. Chem. 248, 2014-2021.

Itakura, T., Watanabe, K., Shiokawa, H. & Kubo, S. (1978) Eur. J. Biochem. 82, 431-437.

Ito, Y., Tomasselli, A.G. & Noda, L.H. (1980) Eur. J. Biochem. 105, 85-92.

Johansson, B.C., Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H., Baccarini-Melandri, A. & Melandri, B. (1973) Eur. J. Biochem. 40, 109-117.

Karu, A.E. & Moudrianakis, E.N. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 129, 655-671.

Katz, E. & Wassink, E.C. (1939) Enzymologia 7, 97-105.

Knobloch, K., Eley, J.H. & Aleem, M.I.H. (1971) Arch. Mikrobiol. 80, 97-114.

Kuby, S.A., Noda, L.H. & Lardy, H.A. (1954) J. Biol. Chem. 210, 65-82.

- Lienhard, G.E. & Secemski, J.J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1121-1123.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.L., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Lundin, A., Lundin, U.K. & Baltscheffsky, M. (1979) Acta Chem. Scan. B 33, 608-609.
- Lundin, A., Rickardson, A. & Thore, A. (1976) Anal. Biochem. 75, 611-620.
- Markland, F.S. & Wadkins, C.L. (1966) J. Biol. Chem. 241, 4124-4135.
- Maurer, H.R. (1971) Berlin, New York de Gruyter Verlag.
- Moudrianakis, E.N. & Tiefert, M.A. (1976) J. Biol. Chem. 25, 7796-8801.
- Müller, H., Neufang, H. & Knobloch, K. (1982) Eur. J. Biochem. 127, 559-566.
- Müller, H. (1982) Dissertation der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
- Murakami, S. & Strotmann, H. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 185, 30-38.
- Neufang, H., Müller, H. & Knobloch, K. (1982a) Biochim. Biophys. Acta 681, 327-329.
- Neufang, H., Müller, H. & Knobloch, K. (1982b) Ber. Deutsch. Bot. Ges. im Druck.
- Noda, L.H. (1973) in: The Enzymes, Boyer, P.D., ed.) Third Edition p. 279-305, New York, Academic Press.
- Noda, L.H. (1958) J. Biol. Chem. 232, 237-250.

Noda, L.H. & Kuby, S.A. (1957a) J. Biol. Chem. 226, 541-549.

Noda, L.H. & Kuby, S.A. (1957b) J. Biol. Chem. 226, 551-558.

Oliver, I.T. (1955) Biochem. J. 61, 116-122.

Price, N.C., Reed, G.H. & Cohen, M. (1973) Biochemistry 7, 4030-4034.

Regnier, F.E. & Gooding, K.M. (1980) Anal. Biochem. 103, 1-25.

Rhoads, D.G. & Lowenstein, J.M. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3963-3972.

Sapico, V., Litwack, G. & Criss, W.E. (1972) Biochim. Biophys. Acta 258, 436-445.

Schlegel, H. G. & Pfennig, N. (1961) Arch. Mikrobiol. 38, 1-39.

Siekewitz, P. & Potter, V.R. (1955) J. Biol. Chem. 215, 237-255.

Smith, J.H.P. & Benitez, A. (1955) in: Modern Methods of Plant Analysis (Paech, K. & Tracey, M.V., eds.) Vol. 4, p. 179 ff. Berlin, Springer Verlag.

Sojka, G.A., Freeze, H.H. & Gest, H. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 136, 578-580.

Sosa, J.M. (1980) Anal. Biochem. 52, 910-912.

Su, S. & Russel, J. (1967) Biochim. Biophys. Acta 132, 370-378.

Terai, H. (1974) J. Biochem. (Tokyo) 75, 1027-1036.

Thornber, J.P., Trosper, T.L. & Strouse, C.E. (1968)
in: The Photosynthetic Bacteria (Clayton, R.K. & Sistrom,
W.R., eds.) p. 236 ff. New York, Plenum Press.

Tomasselli, A.G. & Noda, L.H. (1980) Eur. J. Biochem.
103, 481-491.

Trüper, H.G. & Pfennig, N. (1978) in: The Photosynthetic
Bacteria (Clayton, R.K. & Sistrom, W.R., eds.) p. 19-27,
New York, Plenum Press.

Van Niel, C.B. & Arnold, W. (1938) Enzymologia 5, 244-248.

Watanabe, K. & Kubo, S. (1982) Eur. J. Biochem. 123, 587-592.

Weber, K. & Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.

Whitaker, J.R. (1963) Anal. Chem. 35, 1950-1953.

Winter, A., Perlmutter, H. & Davies, H. (1975) LKB Appli-
cation Note 198.

Herrn Prof. Dr. K. Knobloch danke ich für die Anregung zur Bearbeitung des Themas, für die vielseitige Unterstützung und die fruchtbaren Diskussionen während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Horst Müller danke ich für die gute und reibungslose Zusammenarbeit in allen Bereichen sowie für wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Frau H. Te Pas möchte ich danken für die gute persönliche Zusammenarbeit, die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und für die Anfertigung der Figuren und Bilder.

Frau E. Weitemeyer danke ich für die hilfsbereite Mitarbeit bei den praktischen Arbeiten.

Bei allen Mitarbeitern des Botanischen Instituts, besonders der Abteilung von Prof. Dr. E. Kessler, bedanke ich mich für ihre Kollegialität und freundliche Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Acker und Herrn Dr. Burkhardt danke ich für die Überlassung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Diese Arbeit wurde teilweise durch Sachmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Lebenslauf

Am 8. Juli 1950 wurde ich, Hartmut Julius Neufang, als drittes Kind der Eheleute Erich und Rosemarie Neufang geb. Steffens in Weimar geboren. 1955 übersiedelte die Familie nach Mülheim/Ruhr. Dort besuchte ich von 1957-1961 die Grundschule und von 1961-1971 das Städt. Gymnasium. Im Mai 1971 legte ich dort das Abitur ab. Vom Herbst 1971 bis zum Herbst 1973 absolvierte ich eine Ausbildung als Apothekerpraktikant in der Saarer Apotheke in Mülheim/Ruhr und schloß diese mit dem Vorexamen im September 1973 ab. Von September 1973 bis März 1976 leistete ich zunächst zivilen Ersatzdienst in einem Krankenhaus und arbeitete dann als Vorexaminierter in öffentlichen Apotheken. Im SS 1976 begann ich das Pharmaziestudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Den ersten Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung bestand ich im September 1978 und beendete das Pharmaziestudium durch Ablegen des Staatsexamens am 2. Juni 1980. Am 24. Juni erhielt ich die Approbation als Apotheker. Es folgte eine 5-monatige Tätigkeit in öffentlichen Apotheken. Von November 1980 bis heute bin ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie der Friedrich-Alexander-Universität angestellt. Dort habe ich während dieser Zeit die vorliegende Arbeit angefertigt.

Anhang

Aus den Daten der vorliegenden Dissertation wurden folgende Manuskripte erstellt:

1. On the quantitation of bacteriochlorophyll in chromatophore suspensions from purple bacteria

2. Über die Adenosintriphosphatasen und Adenylatkinasen von Rhodopseudomonas palustris und Rhodopseudomonas sphaeroides

3. Purification and properties of the adenylate kinases from Rhodopseudomonas palustris, Rhodopseudomonas sphaeroides und Rhodospirillum rubrum

4. On the photometric determination of bacteriochlorophyll in aqueous solutions and after extraction with organic solvents

ON THE QUANTITATION OF BACTERIOCHLOROPHYLL IN CHROMATOPHORE SUSPENSIONS
FROM PURPLE BACTERIA

Hartmut Neufang, Horst Müller and Karl Knobloch

Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie der Universität
Erlangen-Nürnberg, Schlossgarten 4, D-8520 Erlangen (West-Germany)

SUMMARY

A direct photometric quantitation of BChl at 375 nm in aqueous chromatophore suspensions from various purple bacteria is described. The assay is rapid and reproducible. It is utilized easily for processing large numbers of samples and is as sensitive as extraction methods usually applied today. Drawbacks of extraction methods, particularly not quantitative extractions, photo- and autooxidation are avoided. There is good linearity up to 20 μg BChl/ml suspension, and no interference by buffers is observed.

Laboratory practice in experiments with aqueous chromatophore suspensions from purple bacteria requires a rapid and sensitive method for the quantitation of bacteriochlorophyll. Methods usually applied today, e.g., the photometric determination of BChl after extraction with organic solvents like ether (1), acetone/methanol 7/2 v/v (2) or methanol (3) are time consuming and inconvenient. Chromatophores have to be ultracentrifuged to separate the aqueous phase, followed by extraction in the cold and dark to avoid photo- and autooxidation. To perform photometric determination it is necessary to centrifuge the BChl-depleted membranes again.

Abbreviations: BChl, bacteriochlorophyll; ϵ , millimolar extinction coefficient.

Extraction methods are often not quantitative and imply instability, particularly evident in methanol. The method according to van Niel and Arnold (4) which includes conversion of BChl into bacteriopheophytin, avoids some of these drawbacks.

BChl extracted by organic solvents from purple bacteria is identical spectroscopically showing one large absorption band at 772 nm which is used for quantitative BChl determinations (2). In aqueous chromatophore suspensions the BChl molecules can interact with each other and with membrane protein, carotenoids and lipids causing absorption peaks in the near IR region to occur at different wavelengths for the different species. The precise forms of the IR absorption spectra also depend on a large variety of parameters, i.e., carbon and electron sources, growth conditions and the age of the cultures (5). This fact has been recognized during early qualitative investigations in BChl (6), but has not been heeded adequately as far as BChl quantitation in aqueous chromatophore suspensions in the IR region is concerned (7). However, at 375 nm (Soret band) such suspensions from purple bacteria reveal an absorption peak which is independent of above mentioned parameters and therefore well fitted for the quantitative photometric determination of BChl.

For this reason, the mM extinction coefficients at 375 nm of aqueous chromatophore suspensions from six species of purple bacteria were determined by direct comparison with two different extraction methods as references which are the method according to Clayton ($\epsilon = 75 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 772 nm) (2) and the method according to van Niel and Arnold ($\epsilon = 9.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 667.8 nm) (4). The calculations are based on the following equation (1 cm pathway):

$$\text{mM extinction coefficient at 375 nm} = \frac{\text{absorbance at 375 nm}}{\text{mmoles BChl per l determined by the reference methods (2,4)}}$$

Hence, we determined for Chromatium vinosum (ATCC 17899), Rhodopseudomonas acidophila (ATCC 25092), R. capsulata (ATCC 11166), R. palustris (ATCC 11169), and R. sphaeroides (ATCC 17023) a mM extinction coefficient of $100 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and for Rhodospirillum rubrum (ATCC 11170) a mM extinction coefficient of $110 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. These values were averaged over 10 BChl determinations from 10 different batch cultures for each organism. We found that at 375 nm the direct photometric BChl quantitations are much faster, and at least as sensitive and reproducible as extraction methods. Our assay is utilized easily for processing large numbers of samples and adaptable equally well to automatic procedures. Using these mM extinction coefficients at 375 nm, the BChl content of the chromatophore suspensions calculated as BChl a in $\mu\text{g/ml}$ can be computed from the following equation (1 cm pathway):

$$\begin{array}{rcl} \mu\text{g BChl/ml} & & \text{absorbance at 375 nm} \times \text{molecular weight} \\ \text{suspension} & = & \text{of BChl } \underline{a} \text{ (911.5)} \\ & & \hline & & \text{mM extinction coefficient at 375 nm} \end{array}$$

There was good linearity in the response pattern up to $20 \mu\text{g BChl/ml}$ suspension. Higher concentrations of BChl could be measured after adequate dilution.

We consider the described method also to be applicable for chromatophore suspensions from other purple bacteria. However, attention has to be paid to the following aspects. Cytochromes likewise absorb at 375 nm. The absorbance of oxidized and reduced species differ at this wavelength and changes in cytochrome redox states have a small effect on the total absorbance at 375 nm. A few species of purple bacteria contain carotenoids which absorb at 375 nm and may vary with growth conditions, etc.. In these cases a mM extinction coefficient determination by use of the described method is advisable to be performed for each strain and set of growth conditions.

Cell material from all species investigated, except C. vinosum, was grown photosynthetically on malate for 48 h at 30°C and at 10 000 lux in 10 liter carboys in a medium modified after Knobloch et al. (8). C. vinosum was grown photosynthetically on thiosulfate in a medium after Bose (9) under the same conditions. Cells were harvested at 4°C in a continuous flow centrifuge, washed once with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), resuspended in the same buffer and broken by sonication for 100 s at 400 W. After centrifugation at 10 000 x g for 30 min to remove cell debris, the supernatant was centrifuged at 20 000 x g for 15 min. The supernatant was ultracentrifuged at 144 000 x g for 100 min. Prior to the photometric measurement, the pellet (chromatophores) from this centrifugation was resuspended by means of a homogenizer (Potter S, B. Braun Melsungen) in 20 mM glycyl-glycine buffer (pH 7.8) or in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), respectively. The kind of buffer applied had no influence on the results. It is necessary to homogenize the suspensions to complete transparency since turbid suspensions cause additional absorbance during photometric measurement due to light scattering. Chromatophores prepared by the above mentioned method involving a three step centrifugation resulted in complete transparent suspensions after homogenization. If, due to certain circumstances, chromatophore preparations have to be quantitated which are not fully transparent, we would like to refer to the technique used by Sojka, Freeze and Gest (10) to reduce light scattering or we recommend to use a scattered transmission accessory.

All photometric measurements were carried out in a Shimadzu UV 210 A Double Beam Spectrophotometer. All solvents and chemicals were of analytical grade.

References

- (1) Weigl, J.W. (1953) J. Amer. Chem. Soc. 75, 999-1000
- (2) Clayton, R.K. (1963) Biochim. Biophys. Acta 75, 312-323
- (3) Smith, J.H.C. and Benitez, A. (1955) in Modern Methods of Plant Analysis (Paech, K., Tracey, M.V., eds.), Vol. 4, pp. 177-182, Springer, Berlin
- (4) Van Niel, C.B. and Arnold, W. (1938) Enzymologia 5, 244-248
- (5) Biebl, H. and Drews, G. (1969) Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2, 123, 425-436
- (6) Wassink, E.C., Katz, E. and Dorrestein, R. (1939) Enzymologia 7, 113-122
- (7) Clayton, R.K. (1963) in Bacterial Photosynthesis (Gest, H., San Pietro, A., Vernon, L.P., eds.), pp. 495-500, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio
- (8) Knobloch, K., Eley, J.H. and Aleem, M.I.H. (1971) Arch. Mikrobiol. 80, 97-114
- (9) Bose, S.K. (1963) in Bacterial Photosynthesis (Gest, H., San Pietro, A., Vernon, L.P., eds.), pp. 501-510, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio
- (10) Sojka, G.A., Freeze, H.H. and Gest, H. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 136, 578-580.

Über die Adenosintriphosphatasen und Adenylatkinasen
von *Rhodopseudomonas palustris* und *Rhodopseudomonas*
sphaeroides

von

Hartmut Neufang, Horst Müller und Karl Knobloch
Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie
der Universität Erlangen-Nürnberg

On the Adenosinetriphosphatases and Adenylate Kinases
from *Rhodopseudomonas palustris* and *Rhodopseudomonas*
sphaeroides

The adenosinetriphosphatasen (ATPases) (EC 3.6.1.3) and adenylate kinases (EC 2.7.4.3) from photosynthetically grown *Rhodopseudomonas palustris* and *Rhodopseudomonas sphaeroides* were purified to homogeneity.

The purified ATPases were characterized by pI values of 5.0 and apparent molecular weights of 350 000. The apparent K_m (ATP)-values in the presence of Ca^{2+} were found to be 0.40 mM for *R. palustris* and 0.35 mM for *R. sphaeroides*. Optimal rates of ATPase activity were achieved at 50°C and pH 8.5 for both ATPases.

The purified adenylate kinases revealed a temperature optimum of 25°C and a pH optimum of 8.0. The *R. palustris* enzyme was characterized by an apparent molecular weight of 33 500 and the *R. sphaeroides* enzyme by 34 400 calculated from high performance liquid chromatography. The pI values from both bacteria were found to be 4.5. The apparent K_m (ADP)-values in the presence of Mg^{2+} corresponded to 0.26 mM for *R. palustris* and 0.27 mM for *R. sphaeroides*.

Key words: Photosynthesis, *Rhodopseudomonas*, ATPase,
Adenylate kinase, Membrane

Einleitung

Adenosintriphosphatasen (ATPasen, ATP phosphohydrolasen, EC 3.6.1.3) und Adenylatkinasen (ATP:AMP phosphotransferasen, EC 2.7.4.3) sind an der Energieregulation in tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Zellen beteiligt.

Die erste Reinigung einer ATPase wurde von Vambutas und Racker (1965) mit Spinat-Chloroplasten unternommen. 1971 gelang die erste Isolierung einer ATPase aus Purpurbakterien. Baccarini-Melandri und Melandri (1971) reinigten die ATPase aus Rhodopseudomonas capsulata. In den folgenden Jahren wurden die ATPasen aus Chromatium vinosum (Hochman und Carmeli, 1971) und aus Rhodospirillum rubrum (Johansson et al., 1973) charakterisiert.

Adenylatkinase wurde zuerst von Colowick und Kalckar (1943) in Kaninchenmuskel gefunden. Adenylatkinasen von Mikroorganismen wurden von Oliver und Peel (1956) untersucht. Chiu et al. (1967) isolierten das Hefeenzym, Holmes und Singer (1973) das Enzym aus Escherichia coli und Terai (1974) das Enzym aus Pseudomonas denitrificans. Von Purpurbakterien wurden bisher noch keine Adenylatkinasen beschrieben.

Ziel dieses Beitrages ist die Reinigung und Charakterisierung der ATPasen und Adenylatkinasen aus Rhodopseudomonas palustris und Rhodopseudomonas sphaeroides. Beide Enzyme konnten mittels derselben Reinigungsschritte isoliert werden.

Material und Methoden

Rhodopseudomonas palustris (ATCC 11168) und Rhodopseudomonas sphaeroides (ATCC 17023) wurden photoheterotroph auf Malat, modifiziert nach Knobloch et al. (1971), kultiviert. Die Gewinnung der Chromatophoren erfolgte nach Müller et al. (1982).

Zellfreies Protein wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) mit Rindalbumin als Standard bestimmt. Die Messung der ATPase-Aktivität und die Methoden der Gelchromatographie, der Hochauflösungsflüssigkeitschromatographie, der Chromatofokussierung und der Fluoreszenzspektralphotometrie wurden, wie früher angegeben (Müller et al. 1982), ausgeführt. Die Adenylatkinase-Aktivität wurde, wie bei Neufang et al. (1982) beschrieben, gemessen.

Ergebnisse

Die ganzen Zellen von R. palustris und R. sphaeroides wurden nach dem Abernten einmal mit 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 gewaschen, im selben Puffer resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung (Labsonic 1510, Braun Melsungen, 400 Watt) von 500 Sekunden in Gegenwart von 1 mM EDTA bei 4°C aufgebrochen. Nach einer Zentrifugation von 30 Minuten bei 10 000 x g wurde der Überstand 100 Minuten bei 144 000 x g ultrazentrifugiert. Die ATPasen und Adenylatkinasen wurden, ausgehend von der Überstandsfraktion S-144 dieser Zentrifugation, gereinigt (Abb. 1). Dazu wurde

1. das bei 40-70%iger Ammoniumsulfatsättigung ausgefällte Protein wieder in wenig Tris-HCl-Puffer pH 8,0 gelöst und weiter gereinigt
2. durch Gelfiltration (Sephacryl S-300 Superfine),
3. durch Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Sephadex A-50),
4. durch Gelfiltration (Sephadex G-75).

Zur Lokalisierung der ATPase-haltigen Fraktionen wurden dabei die schnellen Luciferin-Luciferase- und Fluoreszenz-Methoden angewandt, um die Unterbrechungen zwischen zwei Reinigungsschritten möglichst kurz zu halten. Die Lokalisierung der adenylatkinasehaltigen Fraktionen erfolgte mit der Luciferin-Luciferase-Reaktion wie in Material und Methoden beschrieben.

Die so gereinigten ATPasen und Adenylatkinasen zeigten in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nicht dissoziierenden Bedingungen jeweils nur noch eine Proteinbande. Der Grad der Reinigung während der verschiedenen Schritte ist aus Tabelle 1 zu ersehen. Auf diesem Wege wurde eine 150-fache Anreicherung der ATPasen und eine 200-fache Anreicherung der Adenylatkinasen erzielt.

Die Bestimmung der Molekulargewichte der Adenylatkinasen von R. palustris und R. sphaeroides erfolgte durch Hochauflösungsflüssigkeitschromatographie (Abb. 2) und durch Gelchromatographie mit Sephadex G-75. Durch Hochauflösungsflüssigkeitschromatographie wurde für das R. palustris-Enzym ein Molekulargewicht von 33 500 und für das R. sphaeroides-Enzym ein Molekulargewicht von 34 400 ermittelt (Abb. 2). Die entsprechenden Werte der gelchromatographischen Bestimmung waren 32 500 für R. palustris bzw. 33 500 für R. sphaeroides. Die Molekulargewichte der ATPasen von R. palustris und R. sphaeroides wurden zu je 350 000 ermittelt (Müller et al. 1982).

In den in Abbildung 3 gezeigten Diagrammen ist die Aktivität der gereinigten ATPasen und Adenylatkinasen von R. palustris und R. sphaeroides in Abhängigkeit von der Temperatur bzw. vom pH-Wert dargestellt. Die Optima lagen für die ATPasen bei beiden Bakterien bei 50°C und pH 8,5. Die ATPasen erwiesen sich darüber hinaus als relativ hitzestabil. Nach einer Stunde bei 60°C verblieben noch 50% Aktivität. Aufbewahrung bei -20°C für mehrere Wochen beeinträchtigte die ATPase-Aktivität nicht.

Die Adenylatkinasen waren hitzelabiler als die entsprechenden ATPasen. Gegen niedrige pH-Werte waren die Adenylatkinasen jedoch stabiler als die ATPasen. Optimale Aktivitätsraten wurden für die Adenylatkinasen der beiden untersuchten Bakterien bei 25°C und pH 8,0 gemessen (Abb. 3). Nach 10 Minuten bei 60°C verblieben noch 10% Adenylatkinase-Aktivität.

Mittels der Chromatofokussierung wurden für die ATPasen von R. palustris (Abb. 4) und R. sphaeroides pI-Werte von 5,0 bestimmt. Die pI-Werte der Adenylatkinasen wurden durch isoelektrische Fokussierung zu 4,5 ermittelt (Neufang et al. 1982)

Die Aktivität der ATPasen war in Gegenwart von Ca^{2+} größer als in Gegenwart von Mg^{2+} . Die K_m (ATP)-Werte wurden mittels eines Lineweaver-Burk-Diagrammes ermittelt. Für das R. palustris-Enzym wurde ein K_m (ATP)-Wert von 0,40 mM (Abb. 5), für das R. sphaeroides-Enzym ein K_m (ATP)-Wert von 0,35 mM gefunden. Die K_m (ADP)-Werte für die Adenylatkinasen wurden nach derselben Methode berechnet. Für R. palustris ergab sich ein Wert von 0,26 mM (Abb. 6), für R. sphaeroides ein Wert von 0,27 mM. Die Adenylatkinasen waren jedoch in Gegenwart von Mg^{2+} aktiver als in Gegenwart von Ca^{2+} . Zur Ermittlung der K_m -Werte wurden 1 mM CaCl_2 bzw. 1 mM MgCl_2 eingesetzt (Abb. 5 und 6).

Diskussion

Nach Versuchen mit verschiedenen Säulenchromatographiegelen erwies sich Sephacryl S-300 Superfine als optimales Material zur Trennung der niedrigmolekularen Adenylatkinasen von den hochmolekularen ATPasen. Die weitere Reinigung an DEAE-Sephadex A-50 und Sephadex G-75 stellte die optimale Ergänzung zur Lösung dieses Trennproblems dar. Sepharose 6 B (Baccarini-Melandri und Melandri 1971, Johansson et al. 1973) ergab keine so gute Trennung.

Die pH-Werte von 5,0 und die Molekulargewichte von 350 000 für die ATPasen von R. palustris und R. sphaeroides stimmen gut mit jenen überein, die für R. rubrum-ATPase (Johansson et al. 1973) und R. capsulata-ATPase (Baccarini-Melandri und Melandri 1971) gefunden wurden. Im Gegensatz zu den ATPasen von R. palustris und R. sphaeroides wird R. rubrum-ATPase

(Johansson et al. 1973) als kältestabil beschrieben.

Adenylatkinase aus Kaninchenmuskeln ist äußerst hitzestabil (Colowick und Kalckar 1943). Die entsprechenden Enzyme aus R. palustris und R. sphaeroides sind dagegen wie Ps. denitrificans-Adenylatkinase (Terai 1974) und Hefe-Adenylatkinase (Chiu et al. 1967) hitzelabil. Die Molekulargewichte der Adenylatkinasen von R. palustris (33 500) und R. sphaeroides (34 400) sind dem Molekulargewicht des E. coli-Enzyms von 27 000 (Holmes und Singer 1973) ähnlich, wohingegen die Molekulargewichte des Hefe-Enzyms von 41 000 (Chiu et al. 1967) und des Ps. denitrificans-Enzyms von 21 000 (Terai 1974) stärker abweichen.

- Baccarini-Melandri, A., and B.A. Melandri, 1971: Partial resolution of the photophosphorylating system of Rhodopseudomonas capsulata. Methods Enzymol. 23, 556-561.
- Chiu, C., S. Su, and P.J. Russell, 1967: Adenylate kinase from baker's yeast. I. Purification and intracellular location. Biochim. Biophys. Acta 132, 361-369.
- Colowick, S.P., and H.M. Kalckar, 1943: The role of myokinase in transphosphorylations. I. The enzymatic phosphorylation of hexoses by adenyl pyrophosphate. J. Biol. Chem. 148, 117-126.
- Hochman, A., and C. Carmeli, 1971: A coupling factor from Chromatium strain D chromatophores. FEBS Lett. 13, 36-40.
- Holmes, R.K., and M.F. Singer, 1973: Purification and characterization of adenylate kinase as an apparent adenosine triphosphate dependent inhibitor of ribonuclease II in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 248, 2014-2021.
- Johansson, B.C., M. Baltscheffsky, H. Baltscheffsky, A. Baccarini-Melandri, and B.A. Melandri, 1973: Purification and properties of a coupling factor (Ca^{++} -dependent Adenosine triphosphatase) from Rhodospirillum rubrum. Eur. J. Biochem. 40, 109-117.
- Knobloch, K., J.H. Eley, and M.I.H. Aleem, 1971: Thiosulfate-linked ATP-dependent NAD^{+} -reduction in Rhodopseudomonas palustris. Arch. Microbiol. 80, 97-114.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, 1951: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Müller, H., H. Neufang, and K. Knobloch, 1982: Purification and properties of the coupling factor-ATPases F_1 from Rhodopseudomonas palustris and Rhodopseudomonas sphaeroides. Eur. J. Biochem. 127, 559-566.

- Neufang, H., H. Müller, and K. Knobloch, 1982: Purification and properties of the adenylate kinases from Rhodopseudomonas palustris, Rhodopseudomonas sphaeroides and Rhodospirillum rubrum. Arch. Microbiol., eingereicht zur Veröffentlichung.
- Oliver, I.T., and J.L. Peel, 1956: Myokinase activity in microorganisms. Biochim. Biophys. Acta 20, 390-392.
- Terai, H., 1974: Adenylate kinase from Pseudomonas denitrificans. I. Purification and antiserum inhibition. J. Biochem. (Tokyo) 75, 1027-1036.
- Vambutas, V.K., and E. Racker, 1965: Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. I. Stimulation of photophosphorylation by a preparation of a latent Ca^{++} -dependent adenosine triphosphatase from chloroplasts. J. Biol. Chem. 240, 2660-2667.

Diese Arbeit wurde teilweise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Tabelle 1

Grad der Reinigung der ATPasen und Adenylatkinasen während der verschiedenen Schritte.

Die Messungen erfolgten wie in Material und Methoden beschrieben (ATPase-Aktivität mit CaCl_2).

Reinigungsschritt	ATPase				Adenylatkinase				Spezifische Adenylatkinase-Aktivität in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ R. pal. R. sphaer.			
	Gesamtprotein in mg		ATPase-Aktivität in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$		Gesamtprotein in mg		Adenylatkinase-Aktivität in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$					
	R. pal.	R. sphaer.	R. pal.	R. sphaer.	R. pal.	R. sphaer.	R. pal.	R. sphaer.				
Überstandsfraction S-144	29,5	31,5	10,3	11,3	0,4	0,4	29,5	31,5	13,3	13,5	0,5	0,4
Ammoniumsulfat-Fraktion (40-70%)	11,2	11,5	9,4	9,9	0,8	0,9	11,2	11,5	12,8	12,9	1,1	1,1
Sephacryl S-300 Superfine-Fraktion	2,9	3,1	8,7	9,6	3,0	3,1	3,6	3,6	12,6	12,6	3,5	3,5
DEAE-Sephadex A-50-Fraktion	0,4	0,5	7,5	8,7	18,8	17,4	0,5	0,5	12,2	12,5	24,4	25,0
Sephadex G-75-Fraktion	0,12	0,14	6,8	8,5	56,7	60,7	0,15	0,14	11,6	11,1	77,3	79,3

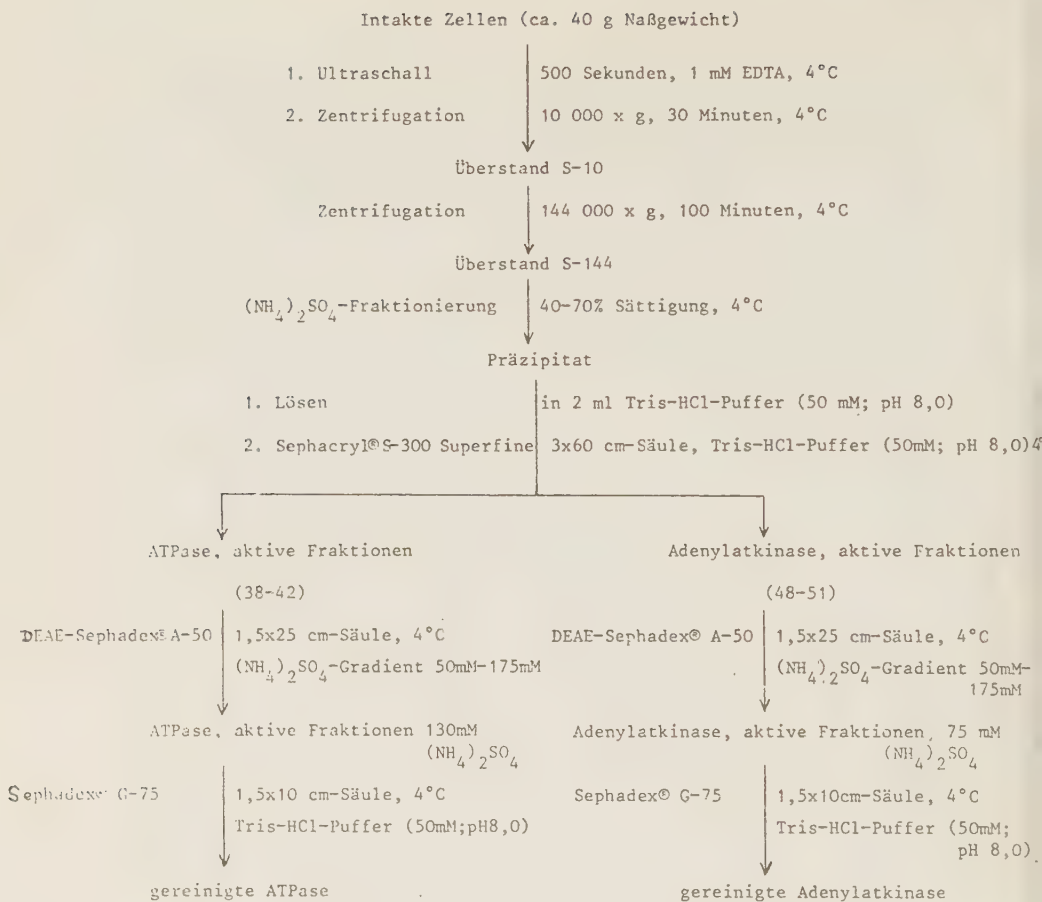


Abb. 1 Reinigungsschema der ATPasen und Adenylatkinasen aus
R. palustris und R. sphaeroides

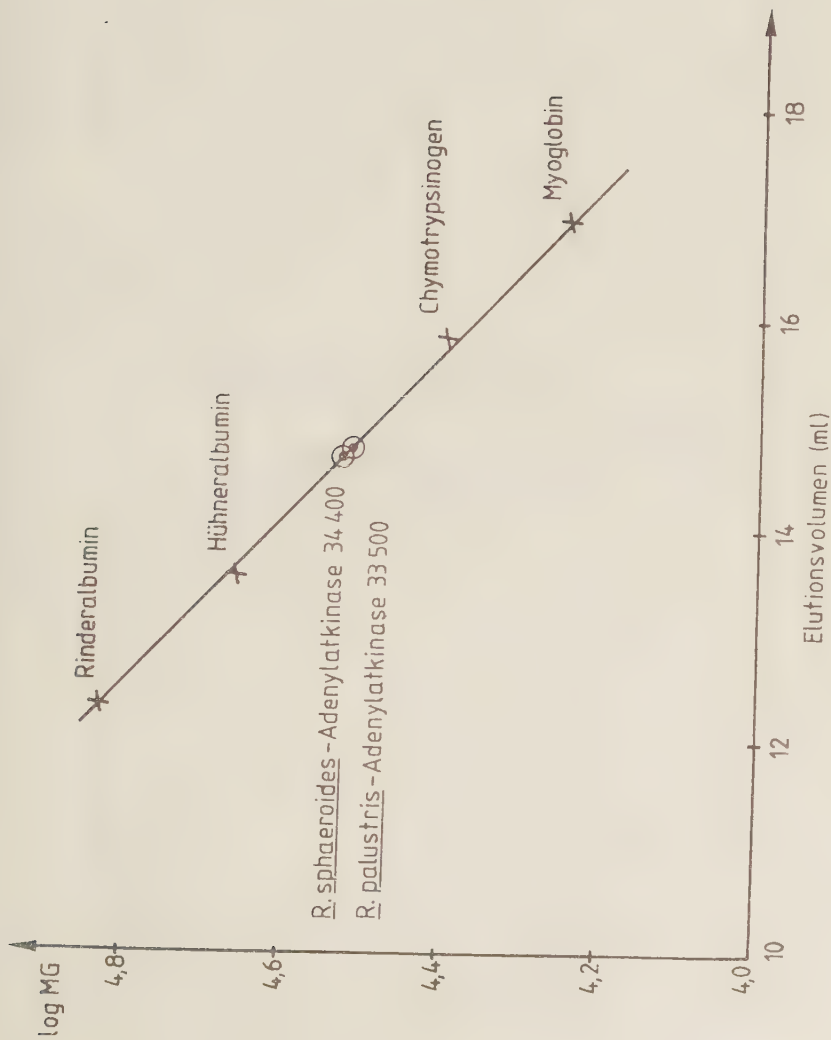


Abb. 2: Molekulargewichtsbestimmung für die Adenylatkinasen von R. palustris und R. sphaeroides mittels Hochauflösungsflüssigkeitschromatographie an einer TSK 3000 SW Trennsäule.

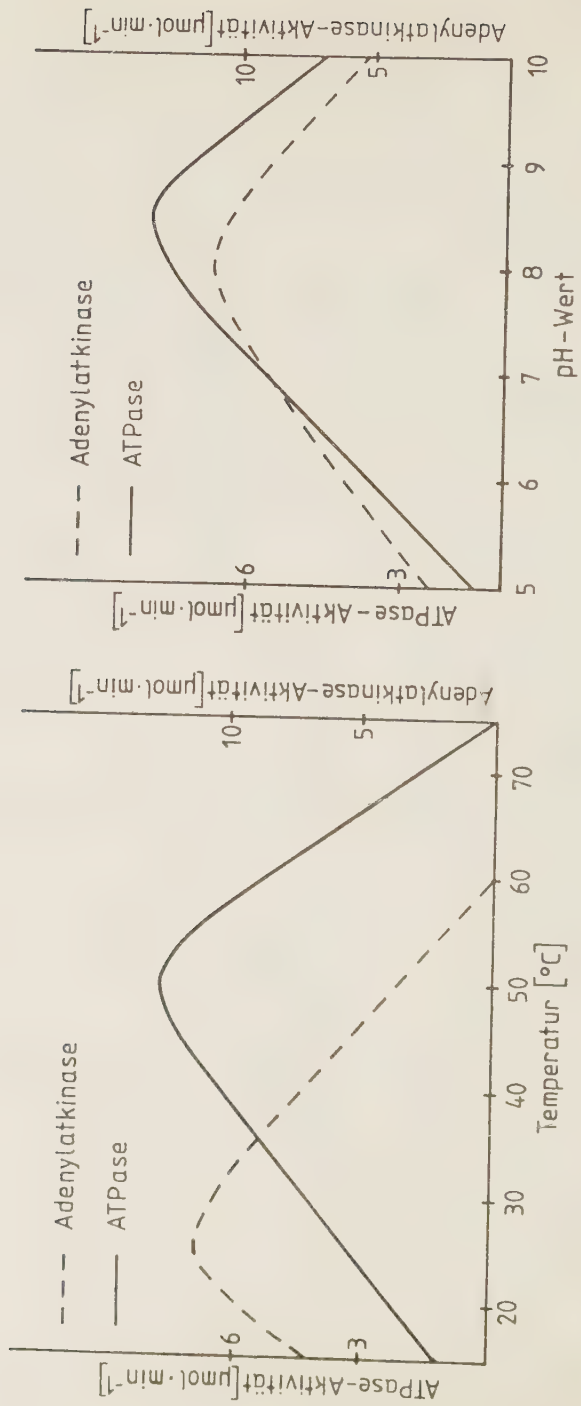


Abb. 3: Die Aktivität der gereinigten ATPasen und Adenylatkinasen aus R. palustris und R. sphaeroides in Abhängigkeit von der Temperatur und dem pH-Wert.

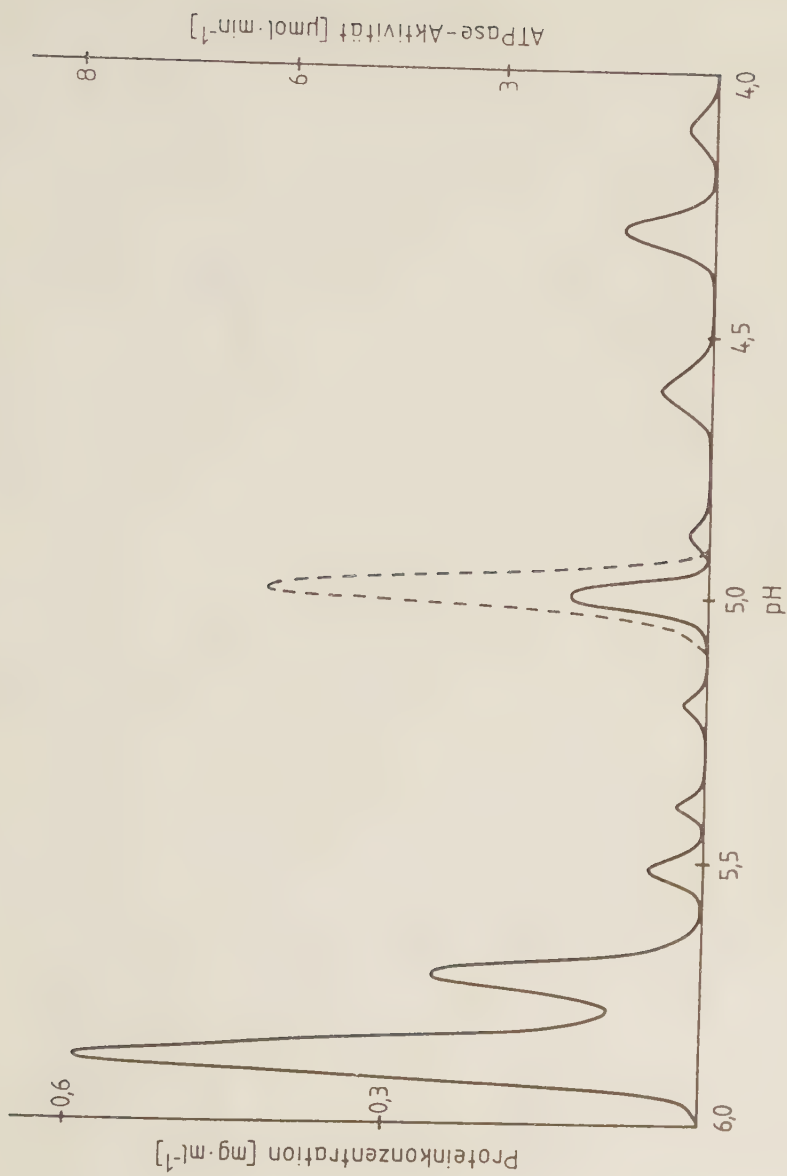


Abb. 4: Elutionsdiagramm der *R. palustris*-ATPase von der Polybuffer-Austauscher 94 Chromatofokussierung zur Bestimmung des pI-Wertes.

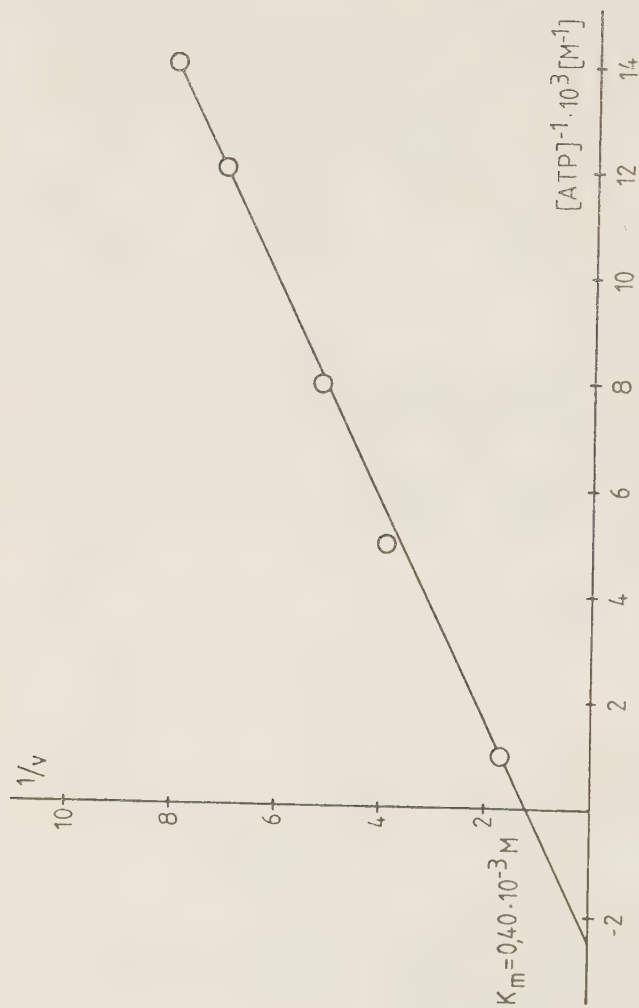


Abb. 5: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Ermittlung des K_m (ATP) -Wertes der R. palustris-ATPase in Gegenwart von 1 mM $CaCl_2$.

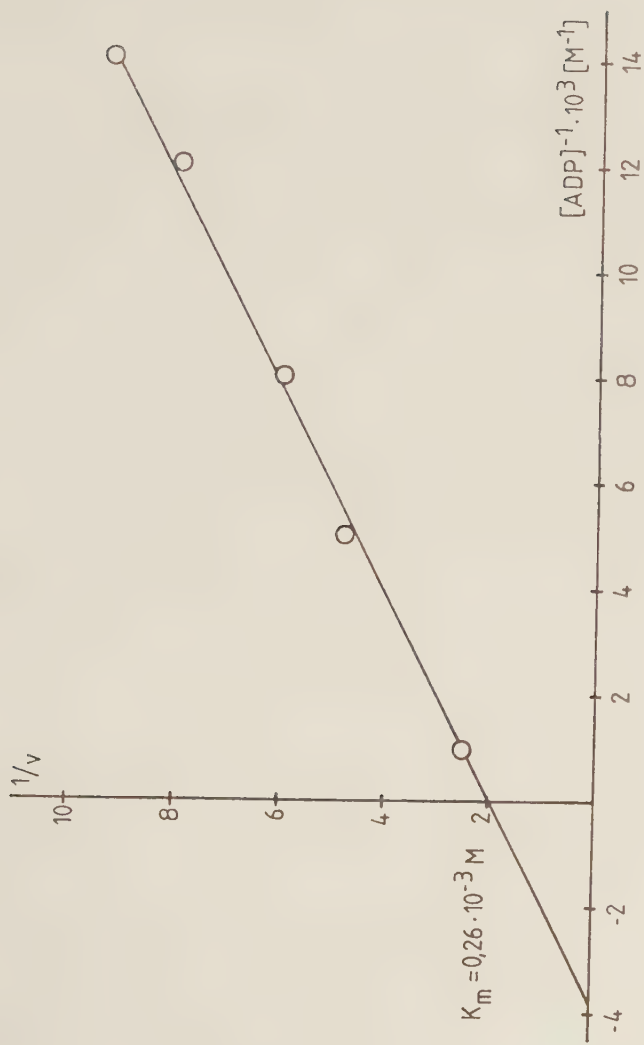


Abb. 6: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Ermittlung des K_m (ADP) -Wertes der R. palustris-Adenylatkinase in Gegenwart von 1 mM $MgCl_2$.

Purification and Properties of the Adenylate Kinases from
Rhodopseudomonas palustris, Rhodopseudomonas sphaeroides
and Rhodospirillum rubrum

Hartmut Neufang, Horst Müller, and Karl Knobloch
 Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie,
 Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg,
 Schlossgarten 4, D-8520 Erlangen

Abstract. The adenylate kinases (EC 2.7.4.3) from photosynthetically grown Rhodopseudomonas palustris, Rhodopseudomonas sphaeroides and Rhodospirillum rubrum were found to be associated with the chromatophores of these organisms. Repeated washing with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, released the enzymes from the membranes. All three adenylate kinases were purified to homogeneity by the same procedure. The purified enzymes showed optimal rates of activity with $MgCl_2$ at 25° C and pH 8.0. They were found to be heat labile and were characterized by pI-values of 4.5. Apparent molecular weights of 33 500 for R. palustris, 34 400 for R. sphaeroides and 32 100 for R. rubrum were determined by high performance liquid chromatography. No separation into subunits was observed by use of sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The apparent K_m -values for ADP corresponded to 0.26 mM for R. palustris, 0.27 mM for R. sphaeroides and 0.24 mM for R. rubrum. ADP in excess had a strong inhibitory effect. Competitive product inhibition was found for AMP, with K_i -values of 0.017 mM for R. palustris, 0.018 mM for R. sphaeroides and 0.014 mM for R. rubrum. A competitive inhibitor likewise was $P^{1,5}$ -di(adenosine-5')pentaphosphate with K_i -values of 0.020 μ M for R. palustris and R. sphaeroides, and 0.017 μ M for R. rubrum. Sulfhydryl-reacting reagents like p-chloromercuribenzoate and iodoacetic acid were found to be non-inhibitory. All measurements of adenylate kinase activity were carried out with the stabilized and most sensitive luciferin-luciferase system.

Key words: Adenylate kinase – Chromatophores – Membranes –
 Photosynthesis – Rhodopseudomonas – Rhodospirillum.

Running title. Properties of adenylate kinases from R. palustris,
R. sphaeroides, R. rubrum.

Introduction

The role of adenylate kinases in intact cells is thought to involve regulation of the energy flow through control of the adenylate pool. The catalysis of the reaction $2 \text{ ADP} = \text{ATP} + \text{AMP}$ is known to occur in many microbial (Oliver and Peel 1956), plant (Moudrianakis and Tiefert 1976; Murakami and Strotmann 1978; Hatch 1982) and animal tissues (Noda and Kuby 1957; Heil et al. 1974; Itakura et al. 1978; Tomasselli and Noda 1980 and Watanabe and Kubo 1982). Some more specific functions of the adenylate kinases concerning C_4 plants have been suggested (Hatch 1982).

The adenylate kinase of mammalian tissue is located in the mitochondrial intermembrane space (Siekevitz and Potter 1955) and the cytosol (Sapico et al. 1972). In spinach chloroplasts, a soluble and a membrane-bound enzyme have been identified (Murakami and Strotmann 1978). Most of the enzyme from baker's yeast (Chiu et al. 1967) and bacteria (Terai 1974, Holmes and Singer 1973) has been found in the supernatant fraction after ultracentrifugation. — Microbial adenylate kinases are similar to the mitochondrial enzyme in so far as no inhibition has been observed by sulfhydryl-reacting reagents (Terai 1974). Immunochemical reactions indicate that the enzyme structure is correlated with the taxonomic or evolutionary status of the enzyme source (Terai 1974).

In view of the universal occurrence of adenylate kinase activity, the characteristics of the enzyme are of interest. Particularly the characterization of adenylate kinases from photosynthetic bacteria is not so well established. The adenylate kinase activity in photosynthetic systems prevents a proper assessment of ATP-ADP exchange reactions due to photophosphorylation. The purpose of the present study is to purify and characterize the adenylate kinases from three different purple bacteria.

Materials and methods

Growth of the cells. Batch cultures of Rhodospseudomonas palustris (ATCC 11168), Rhodospseudomonas sphaeroides (ATCC 17023) and Rhodospirillum rubrum (ATCC 11170) were grown photosynthetically on malate for 48 h at 25° C and at 10 000 lx in 10-1 carboys in a medium modified after Knobloch et al. (1971).

Preparation of cell-free extract S-144. Cells were harvested by a continuous flow centrifuge, washed once with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, resuspended in the same buffer and broken by sonication (Labsonic 1510, Braun Melsungen, 400 W) for 200 s at 4° C. After centrifugation at 10 000 x g for 30 min to remove the cell debris, the supernatant S-10 was ultracentrifuged at 144 000 x g for 100 min to result in the supernatant S-144 and the pellet P-144 (chromatophores).

Assay of adenylate kinase activity. The method according to Oliver (1955) usually applied for the determination of adenylate kinase activity is time consuming and inconvenient. Moreover, the sensitivity of this assay is limited. The most sensitive method for measuring the rate of ATP formation from ADP by the adenylate kinase catalysis is based on the firefly luminescence system which was applied throughout our experiments. Generated ATP was monitored continuously by measuring the light emitted in the firefly luciferase reaction (Lundin et al. 1977) using the ATP Monitoring Reagent according to the manufacturer (LKB Wallac, Turku, Finland) in a special luminometer (Müller et al. 1982).

The reaction mixture contained in a final volume of 1.5 ml : 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 1 mM ADP, 1 mM $MgCl_2$ and 50 μ l LKB ATP Monitoring Reagent. The reaction was started by adding 0.5 μ g protein. Each experiment was calibrated by the addition of a known ATP concentration. All measurements were performed at 25° C.

Other analytical methods. Cell-free protein was estimated by the method of Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as standard.

Bacteriochlorophyll was determined by measuring the absorbance of the chromatophores at 375 nm (Neufang et al. 1982).

Determination of the molecular weights was carried out by gel chromatography on Sephadex G-75 in a 2.5 x 50 cm column and by high performance liquid chromatography as previously described (Müller et al. 1982). The following proteins were used as markers : bovine serum albumin, ovalbumin, myoglobin and cytochrome c.

All runs in isoelectric focusing and non-dissociating polyacrylamide gel electrophoresis were performed as previously described (Müller et al. 1982).

Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis was carried out in a vertical electrophoresis unit on 0.6 x 10 cm columns. Separating gels with 10% acrylamide were employed. Gels were polymerized in 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, plus 14 mM sodium dodecylsulfate. Prior to the electrophoresis the samples were heated with 1% sodium dodecylsulfate and 1% 2-mercaptoethanol in 250 mM phosphate buffer, pH 7.1, at 90° C for 15 min. Reference proteins were : aldolase, bovine serum albumin, ovalbumin, myoglobin and cytochrome c. Electrophoresis was run at room temperature in 25 mM Tris-glycine buffer, pH 8.3, plus 3.5 mM sodium dodecylsulfate for 6 h at 3 mA per gel. Bromophenolblue was used as tracking dye. Protein was visualized by coomassie brilliant blue staining.

Chemicals. Chromatography gels were purchased from Pharmacia (Freiburg F.R.G.), ampholines from LKB (München, F.R.G.). Marker proteins, bromophenolblue and coomassie brilliant blue were products from Serva (Heidelberg, F.R.G.). Nucleoside phosphates were obtained from Boehringer (Mannheim, F.R.G.), P^1, P^5 -di(adenosine-5')pentaphosphate from Sigma (St. Louis, U.S.A.). All other chemicals were of analytical grade, obtained from E. Merck (Darmstadt, F.R.G.).

Results and discussion

Solubilisation of the adenylate kinases. After cell disruption by sonication, 90% of the adenylate kinase activity was found in the supernatant fraction S-144. At least three washings with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, were necessary to release the remaining part of the enzyme protein from the membranes.

Purification of enzymes. The adenylate kinases from Rhodopseudomonas palustris, Rhodopseudomonas sphaeroides and Rhodospirillum rubrum were purified by the same procedure starting from the corresponding cell-free extract S-144.

S-144 was submitted to ammoniumsulfate fractionation. The fraction precipitating between 40 and 70 % saturation was redissolved in a minimum amount of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, and centrifuged at

10 000 x g for 15 min to obtain a clear supernatant solution of about 4.0 ml and a trace of precipitate. The clear supernatant was loaded onto a Sephacryl S-300 Superfine column and eluted with the same buffer (Fig. 1). The application of this gel material shortened the process of purification due to a good pre-separation particularly in regard to the corresponding ATPase and improved the yield of purified enzyme. Fractions of 5.0 ml were collected and those containing an adenylate kinase activity of more than 5 μ mol ATP formed per min and per ml were combined, concentrated and charged onto a DEAE-Sephadex A-50 column previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl plus 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8.0. After washing with a small volume of the same buffer, elution was performed by a linear gradient from 50 mM to 175 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. Both solutions were 200 ml in volume. The enzyme activity was eluted from the column at about 75 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Fractions having an adenylate kinase activity of more than 8 μ mol ATP formed per min and per ml were pooled and, after concentration, filtered through a Sephadex G-75 column. After this final step in purification only those fractions yielding a constant specific activity were collected and further studied.

Table 1 informs about the purification procedures. The final specific adenylate kinase activities obtained were in the range of 70 to 80 μ mol ATP formed per min and per mg protein at 25°C. The overall increase in specific activity was about 200-fold for each enzyme. 1 g protein in the supernatant S-144 yielded about 5 mg of purified enzyme.

Purity of enzymes. The purified enzymes from all three organisms appeared homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis under non-dissociating conditions (Fig. 2 B,C,D) and by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. In all cases only one single protein band was observed on the gels. The enzymes isolated from slices of unstained gel, electrophoresed in the same way, were found in similar regions.

The active fractions eluted from Sephadex G-75 were combined and rechromatographed on the same column. By specific activity analysis, using these active fractions, the enzymes again were found to be homogeneous.

Stability of enzymes. Adenylate kinase from muscle or beef heart mitochondria has been reported to be heat-stable (Albrecht 1970; Colowick and Kalckar 1943). However the enzymes from rat liver (Sapico et al. 1972; Criss et al. 1970), baker's yeast (Chiu et al. 1967), Escherichia coli (Holmes and Singer 1973), Pseudomonas denitrificans (Terai 1974) and the membrane-bound protein from spinach chloroplasts (Murakami and Strotmann 1978) have been described to be heat-labile. The adenylate kinases from R. palustris, R. sphaeroides and R. rubrum also were found to be heat-labile.

About 50% of activity was lost during incubation at 45°C for 10 min or at 60°C for 1 min. The purified enzymes could be stored in a deep freeze for several weeks without losing their adenylate kinase activity. No loss of activity was observed following repeated freezing and thawing, or upon storage at pH 8.0 and 0°C for at least seven days.

Storage of the ammoniumsulfate precipitate at 0°C for six months resulted in about 20% loss of activity. The enzymes were found to be stable at 0°C for one day in a pH range from 7 to 9.

It may also be noted that the enzymes were quite stable at pH 4.0 and pH 12.0 for a short time. Similar properties have been described for the adenylate kinases from baker's yeast (Chiu et al. 1967), Ps. denitrificans (Terai 1974) and beef heart mitochondria (Tomasselli and Noda 1980) where pH-changes have been used even to purify the enzymes.

Molecular weights. The molecular weights of the adenylate kinases from different sources are summarized in Table 2. Data given in this table concerning the enzymes of R. palustris (33 500), R. sphaeroides (34 400) and R. rubrum (32 100) were determined by high performance liquid chromatography on a TSK 3000 SW column. Verification was done with gel chromatography on Sephadex G-75 and sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Slight differences were found in molecular weights of the enzymes studied. Reported numbers of the enzymes from other sources range from 21 000 to 52 000 (Table 2).

There was no evidence for a subunit structure of the three similar enzymes as judged from sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis after treatment with 2-mercaptoethanol and sodium dodecylsulfate at 90°C for 15 min. The apparent molecular weights calculated by plotting the relative mobility of each band on the gel in a calibration curve obtained with standard proteins were found to be 32 800 for R. sphaeroides, 32 100 for R. palustris and 30 900 for R. rubrum. These data suggest that the enzymatically active adenylate kinases from all three bacteria exist as a single polypeptide chain.

Isoelectric points. Isoelectric focusing revealed isoelectric points of 4.5 for the adenylate kinases from R. palustris (Fig. 3), R. sphaeroides and R. rubrum. In table 2 the pI-values from other sources are summarized. By this criterium the adenylate kinases can be divided into two groups, with an alkaline pI and an acidic pI, respectively. Those adenylate kinases having an acidic pI, including the enzymes from the photosynthetic bacteria studied in this paper, appear to be acid-labile (Itakura et al. 1978). Isoelectric focusing of the mitochondrial enzymes from pig heart (Itakura et al. 1978) and beef heart (Tomasselli and Noda 1980) has been reported to result in two peaks of activity.

Metal ion specificity. Several divalent cations were effective in potentiating the enzymatic activity of the adenylate kinases from R. palustris, R. sphaeroides and R. rubrum. The order of decreasing effectiveness was $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Zn^{2+}$ as can be seen from Table 3. Some activity also was observed with Ba^{2+} and Fe^{2+} although this may be due to the presence of traces of contaminating Mg^{2+} or Ca^{2+} . The adenylate kinases from all three bacteria studied were activated maximally by a molar ratio of Mg^{2+} : ADP of 1.0. This result is in agreement with the finding for adenylate kinase from rabbit muscle (Kalckar 1943) which enzymatic activity is optimal in $MgCl_2$, and suggests that the enzyme reacts with the divalent cation complexes of ADP. It may be noted here that

most enzymes involving adenosine phosphates, e. g., ATPase (Müller et al. 1982) or creatine phosphokinase (Kuby et al. 1954) also react optimally with the Mg^{2+} or Ca^{2+} complexes as the functional substrates. In the presence of sufficient EDTA to complex available divalent cations, the enzyme was strongly inhibited. Other adenylate kinases also have been reported to substitute divalent metal ions for Mg^{2+} and the order of metal ion reactivity has been found to be variable from one adenylate kinase to another, but Mg^{2+} always has given the highest activity (Chiu et al. 1967; Holmes and Singer 1973). Free divalent cations in excess showed an inhibitory effect. A pronounced inhibition of the initial activity rates of the adenylate kinases from rabbit muscle (Noda 1958) and maize leaves (Hatch 1982) have been observed when the Mg^{2+} concentrations were in excess. Such an inhibitory effect has not been observed with the enzyme from baker's yeast; a 20-fold excess ratio of Mg^{2+} to ADP has not shown a significant decrease in the rate of catalysis (Chiu et al. 1967). The membrane-bound chloroplast adenylate kinase was not influenced by a 10-fold excess of Mg^{2+} (Murakami and Strotmann 1978).

Optimum of pH and temperature. Optimal rates of adenylate kinase activity were achieved at about 25°C and pH 8.0 for all three bacteria studied. Therefore, all routine assays were carried out at 25°C and pH 8.0. The yeast enzyme has been shown to reveal a sharp reaction optimum at pH 7.7 (Chiu et al. 1967) while for the enzyme from rabbit muscle (Noda 1958) and Ps. denitrificans (Terai 1974) a broad pH-optimum has been observed.

Michaelis constants. K_m (ADP)-values from several sources are summarized in Table 2. They are similar except for the numbers of bovine liver mitochondrial enzyme (1.80 mM), and of the enzymes from E. coli (0.09 mM) and from maize leaves (0.07 mM) (Table 2). The apparent K_m -values for ADP, determined in the presence of 1 mM $MgCl_2$ from Lineweaver-Burk plots, corresponded to 0.26 mM for R. palustris (Fig. 4), 0.27 mM for R. sphaeroides and 0.24 mM for R. rubrum. It is shown in Fig. 4 that the reciprocal plot for the dismutation of ADP appears linear indicating that the velocity of the reaction was a function of the ADP concentration. This implies that for the catalytic adsorption

of ADP one site only is present on the adenylate kinases studied since, if two molecules of ADP were activated simultaneously, a curve convex towards the $1/[ADP]$ axis would be observed on plotting $1/v$ against $1/[ADP]$. A linear plot with $1/[ADP]^2$, as would be expected from the equation $2 ADP = ATP + AMP$, has been obtained for the rabbit muscle enzyme (Noda 1958). Concerning the binding sites and the reaction mechanism of the adenylate kinases one can distinguish two groups of enzymes. One of them involves the enzymes from rabbit muscle (Noda 1958), baker's yeast (Ito et al. 1980) and beef heart mitochondria (Tomasselli and Noda 1980), with the well established reaction mechanism of two independent binding sites for two different forms of ADP, probably free ADP and $(Mg-ADP)^-$ (Price et al. 1973; Noda 1973). The other group of enzymes, i. e. the adenylate kinases from bovine liver mitochondria (Markland and Wadkins 1966), Ps. denitrificans (Terai 1974), maize leaves (Hatch 1982), and the soluble and membrane-bound enzyme from spinach chloroplasts (Murakami and Strotmann 1978) reveal a linear plot with $1/[ADP]$ similar to the corresponding enzymes from the photosynthetic bacteria described in this article which implies only one binding site for the substrate $(Mg-ADP)^-$.

Inhibition of enzymes. ADP exhibits a pronounced substrate inhibition effect. We found $K_i(ADP)$ -values of 0.32 mM for the enzyme from R. palustris and R. sphaeroides, and a $K_i(ADP)$ -value of 0.34 mM for R. rubrum adenylate kinase. A $K_i(ADP)$ of 1.58 mM has been reported for the rabbit muscle enzyme (Callaghan and Weber 1959).

AMP was a product inhibitor on the studied adenylate kinases. Inhibition was found competitive to ADP as can be seen from Fig. 4 and 5 A. $K_i(AMP)$ -values, determined from Dixon plots corresponded to 0.017 mM for R. palustris (Fig. 5 A), 0.018 mM for R. sphaeroides and 0.014 mM for R. rubrum. A $K_i(AMP)$ of 0.5 mM has been described for the rabbit muscle enzyme (Callaghan and Weber 1959).

A competitive inhibitor likewise was P^1, P^5 -di(adenosine-5')penta-phosphate with K_i -values of 0.02 μM for both, R. palustris (Fig. 5 B) and R. sphaeroides, and 0.017 μM for the R. rubrum enzyme, determined from Dixon plots. The enzyme from beef heart mitochondria has been reported to be inhibited completely by rather high concentrations of P^1, P^5 -di(adenosine-5')pentaphosphate (Tomasselli and Noda 1980).

Fluoride has been found to inhibit the adenylate kinase from rabbit muscle (Noda and Kuby 1957), rat liver (Criss et al. 1970) and beef heart mitochondria (Tomasselli and Noda 1980) by a chelating effect, although no inhibitory effect on the enzyme from Ps. denitrificans (Terai 1974) has been observed. The enzymes from R. palustris, R. sphaeroides and R. rubrum were inhibited completely by 0.3 M sodium fluoride. About 50% inhibition has been described for the adenylate kinase from rat muscle and liver at 0.02 M fluoride (Barkulis and Lehninger 1951). —

It has been demonstrated that the adenylate kinases from rabbit muscle (Noda 1958), rat liver cytosol (Sapico et al. 1972) and the membrane-bound enzyme from spinach chloroplasts (Murakami and Stotermann 1978) were inhibited non-competitively by sulfhydryl-reacting reagents, whereas no inhibitory effect has been found on the enzymes from rat liver mitochondria (Criss et al. 1970), baker's yeast (Chiu et al. 1967) and Ps. denitrificans (Terai 1974). The enzymes from R. palustris, R. sphaeroides and R. rubrum also were not inhibited by p-chloromercuribenzoate and iodoacetic acid even after incubation at 25° C for 8 h. This indicates that the active center of these enzymes contains no free sulfhydryl groups, or that sulfur is present as disulfide which has been reported to be the case with the homologous enzyme from bovine liver mitochondria (Markland and Wadkins 1966).

This study has been supported partly by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

References

- Albrecht G J (1970) Purification and properties of nucleoside triphosphate-adenosine monophosphate transphosphorylase from beef heart mitochondria. *Biochemistry* 9, 2462-2470
- Barkulis S S , Lehninger A L (1951) Myokinase and the adenine nucleotide specificity in oxidative phosphorylations. *J. Biol. Chem.* 190, 339-344
- Callaghan O H , Weber G (1959) Kinetic studies on rabbit muscle myokinase. *Biochem. J.* 73, 473-485
- Chiu C , Su S , Russell P J (1967) Adenylate kinase from baker's yeast. I. Purification and intracellular location. *Biochim. Biophys. Acta* 132, 361-369
- Colowick S P , Kalckar H M (1943) The role of myokinase in transphosphorylations. I. The enzymatic phosphorylation of hexoses by adenyl pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* 148, 117-126
- Criss W E , Sapico V , Litwack G (1970) Rat liver adenosine triphosphate: Adenosine monophosphate phosphotransferase activity. I. Purification and physical and kinetic characterization of adenylate kinase III. *J. Biol. Chem.* 245, 6346-6351
- Hatch M D (1982) Properties and regulation of adenylate kinase from Zea mays leaf operating in C_4 pathway photosynthesis. *Austr. J. Plant. Physiol.* 9, 287-296
- Heil A , Müller G , Noda L , Pinder T , Schirmer H , Schirmer I , von Zabern I (1974) The amino-acid sequence of porcine adenylate kinase from skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 43, 131-144
- Holmes R K , Singer M F (1973) Purification and characterization of adenylate kinase as an apparent adenosine triphosphate dependent inhibitor of ribonuclease II in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 248, 2014-2021
- Itakura T , Watanabe K , Shiokawa H , Kubo S (1978) Purification and characterization of acidic adenylate kinase in porcine heart. *Eur. J. Biochem.* 82, 431-437
- Ito Y , Tomasselli A G , Noda L H (1980) ATP:AMP phosphotransferase from baker's yeast. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 105, 85-92
- Kalckar H M (1943) The role of myokinase in transphosphorylations. II. The enzymatic action of myokinase on adenine nucleotids. *J. Biol. Chem.* 148, 127-137
- Knobloch K , Eley J H , Aleem M I H (1971) Thiosulfate-linked ATP-dependent NAD^+ -reduction in Rhodopseudomonas palustris. *Arch. Mikrobiol.* 80, 97-114

- Kuby S A , Noda L , Lardy H A (1954) Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase. III Kinetic studies. J. Biol. Chem. 210, 65-82
- Lowry O H , Rosebrough N J , Farr A L , Randall R J (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275
- Lundin A , Thore A , Baltscheffsky M (1977) Sensitive measurement of flash induced photophosphorylation in bacterial chromatophores by firefly luciferase. FEBS Lett. 79, 73-76
- Markland F S , Wadkins C I (1966) Adenosine triphosphate-adenosine 5' monophosphate phosphotransferase of bovine liver mitochondria. I. Isolation and chemical properties. J. Biol. Chem. 241, 4124-4135
- Moudrianakis E N , Tiefert M A (1976) Synthesis of bound adenosine triphosphate from bound adenosine diphosphate by the purified coupling factor 1 of chloroplasts. J. Biol. Chem. 25, 7796-7801
- Müller H , Neufang H , Knobloch K (1982) Purification and properties of the coupling factor-ATPases F_1 from Rhodopseudomonas palustris and Rhodopseudomonas sphaeroides. Eur. J. Biochem., in press
- Murakami S , Strotmann H (1978) Adenylate kinase bound to the envelope membranes of spinach chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 185, 30-38
- Neufang H , Müller H , Knobloch K (1982) On the quantitation of bacteriochlorophyll in chromatophore suspensions from purple bacteria. Biochim. Biophys. Acta 681, 327-329
- Noda L (1958) Adenosine triphosphate-adenosine monophosphate transphosphorylase. III. Kinetic studies. J. Biol. Chem. 232, 237-250
- Noda L , Kuby S A (1957) Adenosine triphosphate-adenosine monophosphate transphosphorylase. I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit skeletal muscle. J. Biol. Chem. 226, 541-549
- Noda L H (1973) Adenylate kinase. In: The Enzymes, 3rd edn., pp. 279-305, Boyer P D ed. Academic Press, New York
- Noda L , Schulz G E , van Zabern I (1975) Crystalline adenylate kinase from Carp muscle. Eur. J. Biochem. 51, 229-235
- Oliver I T (1955) A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. Biochem. J. 61, 116-122
- Oliver I T , Peel J L (1956) Myokinase activity in microorganisms. Biochim. Biophys. Acta 20, 390-393
- Price N C , Reed G H , Cohn M (1973) Magnetic resonance studies of substrate and inhibitor binding to porcine muscle adenylate kinase. Biochemistry 12, 3322-3327

- Sapico V , Litwack G , Criss W E (1972) Purification of rat liver adenylate kinase isozyme II and comparison with isozyme I. Biochim. Biophys. Acta 258, 436-445
- Siekevitz P , Potter V R (1955) Biochemical structure of mitochondria. J. Biol. Chem. 215, 237-255
- Terai H (1974) Adenylate kinase from Pseudomonas denitrificans. I. Purification and antiserum inhibition. J. Biochem. (Tokyo) 75, 1027-1036
- Tomasselli A G , Noda L H (1980) Mitochondrial ATP:AMP phosphotransferase from beef heart: Purification and properties. Eur. J. Biochem. 103, 481-491
- Watanabe K , Kubo S (1982) Mitochondrial adenylate kinase from chicken liver. Purification, characterization and its cell free synthesis. Eur. J. Biochem. 123, 587-592

Table 2. Comparison of adenylate kinases from different sources.

Data were taken from the references given in the last column.

Source of enzyme	Molecular weight	K_m for ADP [mM]	pI	Reference
Carp muscle	21 700	--	5.9	(Noda et al. 1975)
Rabbit muscle	21 000	0.3	6.1	(Noda and Kuby 1957)
Bovine liver mitochondria	21 500	1.8	--	(Markland a. Wadkins 1966)
Beef heart mitochondria	52 000	0.29	9.3	(Albrecht, G.J. 1970 Tomasselli u. Noda 1980)
Rat liver mitochondria	46 000	0.18	--	(Criss et al. 1970)
Rat liver cytosol	46 000	0.3	--	(Sapico et al. 1972)
Baker's yeast	41 000	0.3	5.9	(Chiu et al. 1967)
<u>E. coli</u>	27 000	0.09	--	(Holmes and Singer 1973)
<u>Ps. denitrificans</u>	21 000	0.25	--	(Terai 1974)
Maize chloroplasts	--	0.07	--	(Hatch 1982)
Spinach chloroplasts	--	0.13	--	(Murakami a. Strotmann 1978)
<u>R. palustris</u>	33 500	0.26	4.5	Present article
<u>R. sphaeroides</u>	34 400	0.27	4.5	Present article
<u>R. rubrum</u>	32 100	0.24	4.5	Present article

Table 3. Metal ion specificity of the adenylate kinases from R. palustris, R. sphaeroides and R. rubrum. 0.5 μ g purified protein was assayed according to Materials and Methods. The final concentration of each metal chloride was 1 mM.

Metal ion added	Relative activity [%]		
	<u>R. palustris</u>	<u>R. sphaeroides</u>	<u>R. rubrum</u>
Mg ²⁺	100	100	100
Ca ²⁺	73	75	72
Co ²⁺	68	68	66
Mn ²⁺	51	52	51
Zn ²⁺	45	47	43
Ba ²⁺	8	6	6
Fe ²⁺	3	4	4

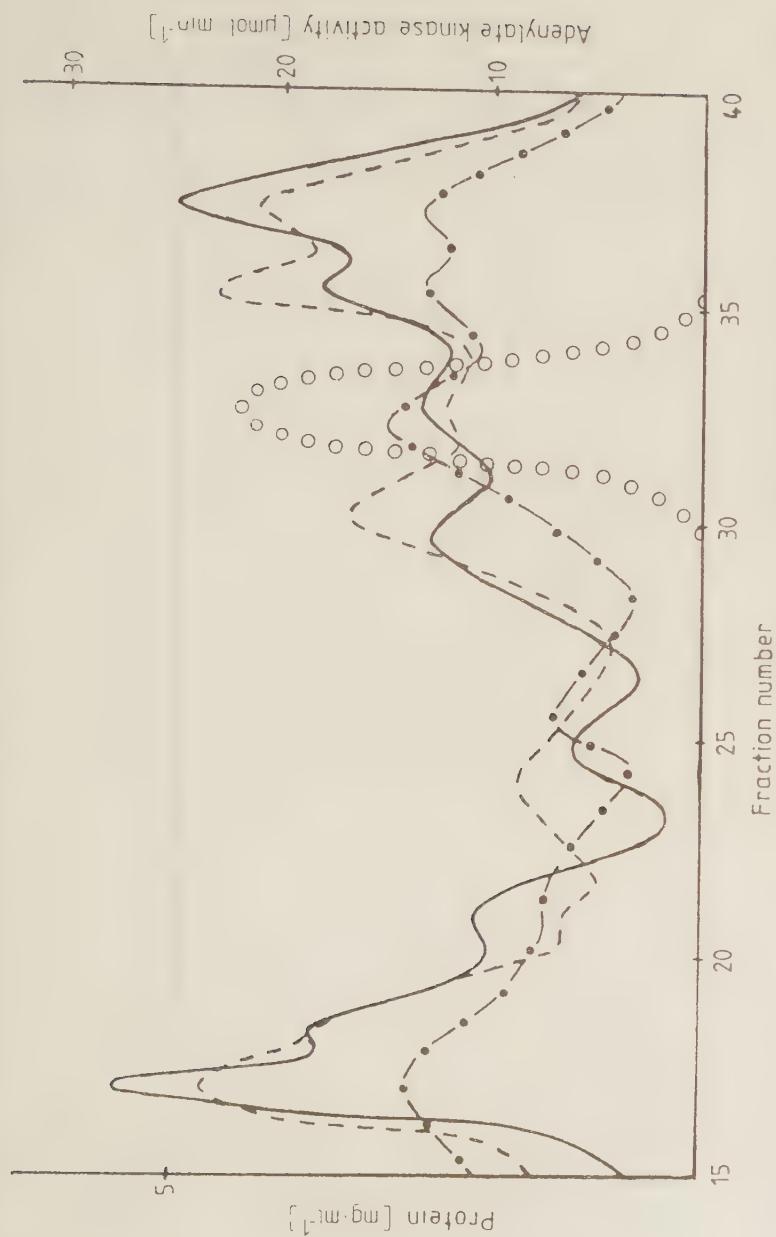


Fig. 1. Elution profile of adenylate kinases from Sephadex S-300 Superfine gel chromatography. Adenylate kinase activity was assayed with 20 μ l of each fraction according to Materials and Methods. (—) *K. rubra*-protein, (---) *K. palustris*-protein, (●—) *R. sphaeroides*-protein (OO) adenylate kinase activity.



Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis pattern obtained under non-dissociating conditions. The electrophoreses were run according to Materials and Methods. R. palustris enzyme after elution from DEAE-Sephadex A-50 (A), R. sphaeroides enzyme (B), R. rubrum enzyme (C), and R. palustris enzyme (D) after elution from Sephadex G-75

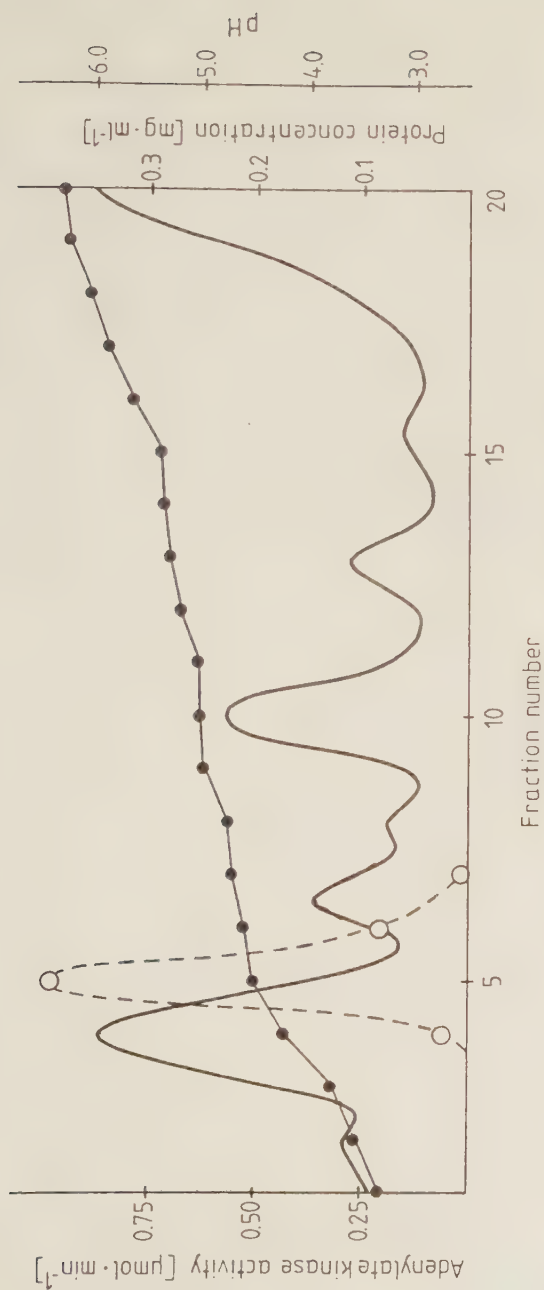


Fig. 3. Isoelectric focusing of *R. palustris* enzyme. The focusing was performed as described in Materials and Methods. Adenylyl kinase activity was assayed as mentioned under Fig. 2. (—) Protein concentration, (—○—) adenylyl kinase activity, (—●—) pH gradient

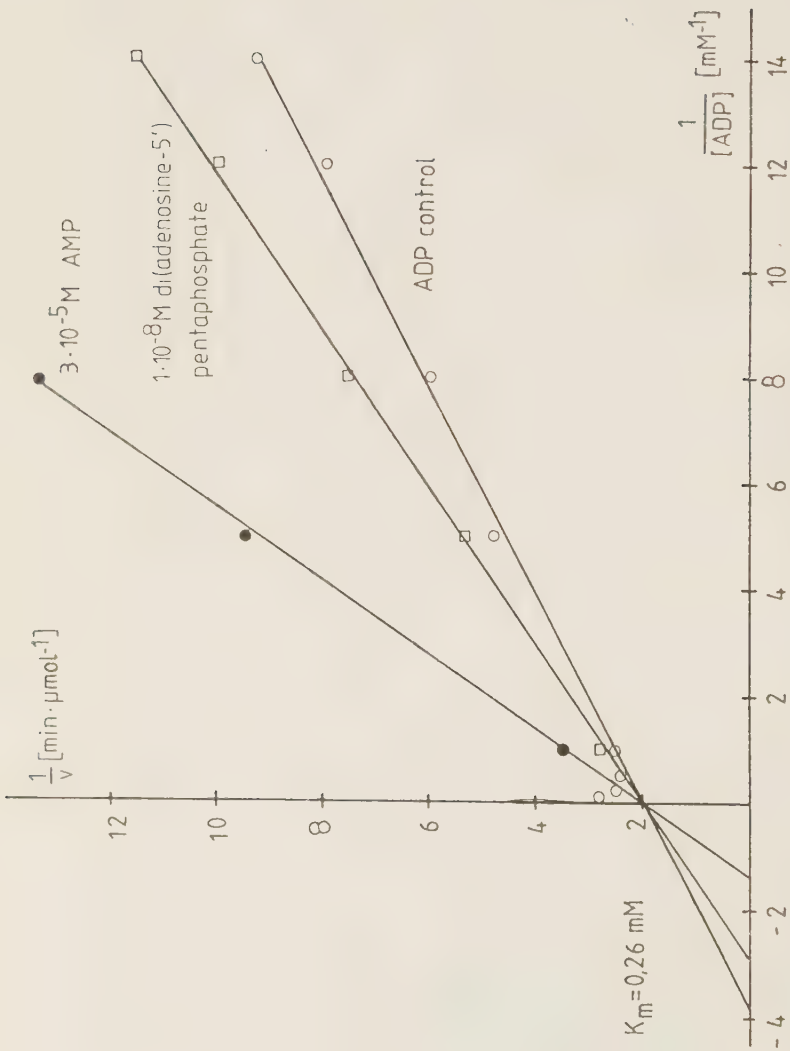


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of the adenylate kinase from *R. palustris* with varied concentrations of ADP and competitive inhibition by 3×10^{-5} M AMP and 10^{-8} M diadenosine-5' pentaphosphate, respectively. Adenylate kinase activity was assayed according to Materials and Methods without (ADP control) and with the indicated concentrations of each inhibitor.

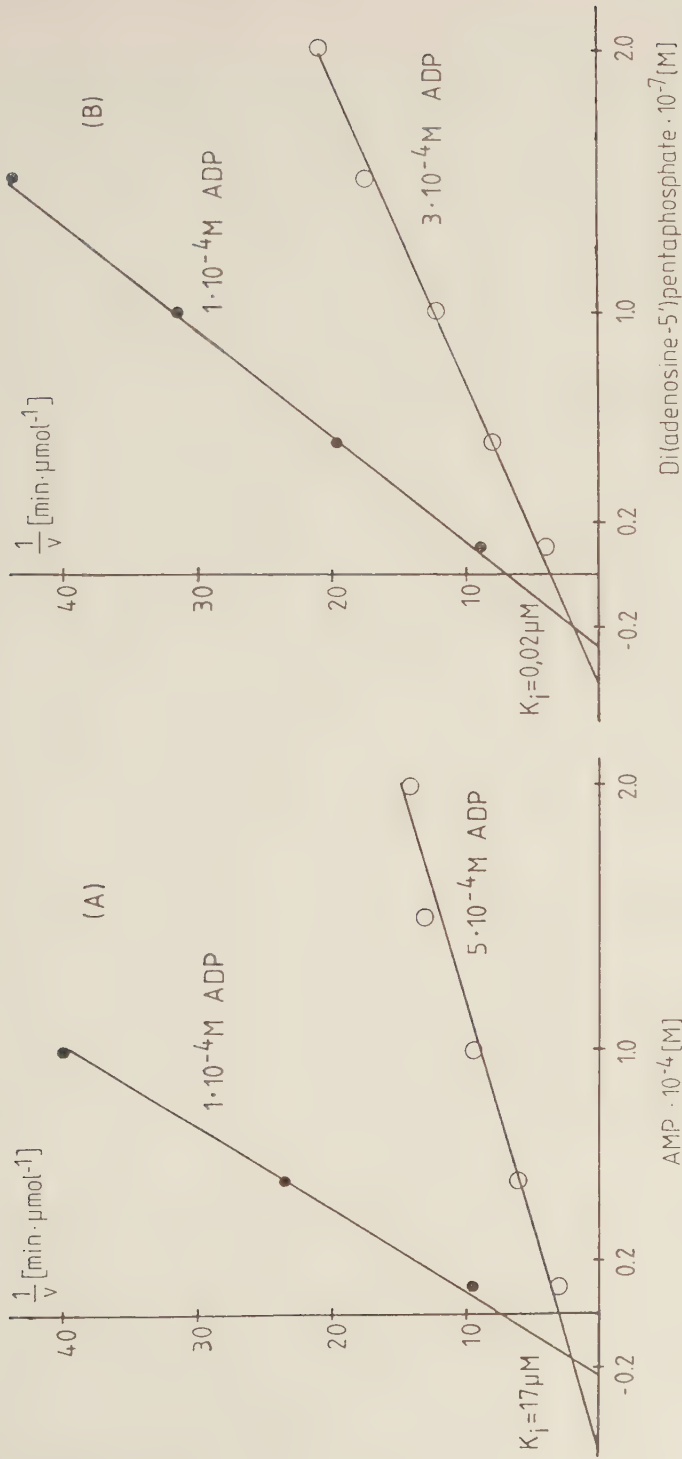


Fig. 5. Dixon plots of the adenylate kinase from *R. palustris*. Adenylate kinase activity was measured as described under Materials and Methods with the indicated concentrations of ADP and inhibitor, AMP (A) and di(adenosine-5')pentaphosphate (B).

On the Photometric Determination of Bacteriochlorophyll in Aqueous Solutions and After Extraction with Organic Solvents

Hartmut Neufang, Horst Müller and Karl Knobloch

Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie der Universität
Erlangen-Nürnberg, Schlossgarten 4, D-8520 Erlangen, F.R.G.

A comparison is presented on quantitative determination of bacteriochlorophyll from purple bacteria in aqueous solutions (buffer) and after extraction with organic solvents.

Solutions of bacteriochlorophyll in organic solvents (acetone/methanol or methanol) were instable. Absorbance in methanol decreased for about 24% and in acetone/methanol for about 7% within one minute when exposed to light. In contrast, the determination in aqueous solutions revealed stable numbers.

After one single extraction a quantitative determination of bacteriochlorophyll was not achieved. A first extraction yielded 80-95% of the total bacteriochlorophyll.

Concerning the determinations in buffer, differences in the infrared spectra were observed as a function of growth conditions. No interferences with cytochrome absorptions could be noticed at ultraviolet wavelengths.

All methods investigated revealed linearity from 2 to 20 μg bacteriochlorophyll per ml, except for the determination at 880 nm in aqueous solutions which appeared to be linear up to 10 μg bacteriochlorophyll per ml.

The reproduceability of the extraction methods was represented by relative standard deviations of 4.2% for the methanol and 2.4% for the

Abbreviations used: BChl, bacteriochlorophyll; BSA, bovine serum albumin; ϵ , millimolare extinction coefficient; SD, standard deviation of series

acetone/methanol extraction. The corresponding numbers for measurements in aqueous solutions were found to be 1.05% at 880 nm and 0.96% at 375 nm.

The determination in buffer at 375 nm appeared to be the most practicable method for the quantitation of bacteriochlorophyll in chromatophores and, after adequate treatment in whole cells as well.

All purple bacteria are characterized by a stable absorption band at 375 nm.

INTRODUCTION

In laboratory practice the quantitation of BChl in whole cells and in preparations of photosynthetic bacteria is important since the BChl content is used as a basis for comparing various photochemical and biochemical activities. BChl concentration is either estimated by photometric measurement after extraction with organic solvents like acetone/methanol (1,2) and methanol (3,4) or by a direct photometric measurement in aqueous solutions. The different determinations in buffer are performed in the infrared region (5), at 375 nm (6), or in a bovine serum albumin solution using relative absorbances (7,8).

Except for the quantitation at 375 nm, all the other methods revealed non reliable results due to several drawbacks.

Extraction methods with organic solvents result in the instability of BChl especially when exposed to light. Likewise, the usually applied single extraction with organic solvents does not result in quantitative amounts of BChl.

The determination in buffer using ir wavelenghts is hampered since differences in the absorption spectra occur as a function of growth conditions (9,10).

The present investigation compares the different BChl determinations in regard to convenience and analytical parameters.

MATERIALS AND METHODS

Growth of the cells. Batch cultures of Rhodopseudomonas palustris (ATCC 11168) and Rhodospirillum rubrum (ATCC 11170) were grown photo-synthetically on malate for 48 h at 30 °C and 10 000 lx in 10-l carboys in a medium modified after Knobloch et al. (11). R. palustris cells were grown alternatively on thiosulfate as the electron source (11) under the same conditions.

Preparation of chromatophores. Cells were harvested, washed once with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 and after resuspension they were sonified (Labsonic 1510, Braun Melsungen F.R.G., 400 W) for 2 min at 4 °C. To remove unbroken cells the suspension was centrifuged at 10 000 x g for 30 min. The supernatant again was centrifuged at 20 000 x g for 15 min to separate cell debris. The resulting supernatant was ultracentrifuged at 144 000 x g for 100 min. The pellet from the ultracentrifugation (chromatophores) was homogenized (homogenizer Potter S, B. Braun Melsungen, F.R.G.) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0.

Bacteriochlorophyll determinations after extraction. I. According to Clayton (1), the chromatophore preparations were extracted with 10 volumes acetone/methanol (7/2 v/v). After centrifugation at 5 000 x g for 10 min the supernatant was assayed against a corresponding blank at 772 nm (1). - II. As described by Smith and Benitez (3), the chromatophores were extracted with 10 volumes methanol and photometric determination was performed at 772 nm. - III. According to van Niel and Arnold (4), the chromatophores were extracted with 10 volumes methanol and centrifuged immediately. The supernatant was added to 1.5 volumes of carbon tetrachloride plus 0.1 volume of 25 % hydrochloric acid to convert BChl into bacteriopheophytin. The mixture was estimated at 667.8 nm against a corresponding blank.

2

Bacteriochlorophyll determination in aqueous solutions. Determinations in aqueous buffer at 880 nm (5) or at 375 nm (6) were carried out with the chromatophore preparations after adequate dilution.

The millimolare extinction coefficients (ϵ) for the methods applied (1,4,5,6) were $\epsilon = 75 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (1), $\epsilon = 9.9$ (4), $\epsilon = 140$ for R. rubrum (5), $\epsilon = 100$ for R. palustris and 110 for R. rubrum, respectively (6).

Stability test in organic solvents. Measurements were performed as described above and the absorbance was estimated in intervals as given in Fig. 1. Inbetween the single read outs the reaction mixture was exposed to light.

Sufficiency of extraction. The assays were extracted according to Clayton (1) and van Niel and Arnold (4). The same procedure was repeated three times using the resulting pellet obtained after the first extraction in order to reach total BChl extraction.

Effect of cytochrome absorption. Three identical samples were measured at 375 nm. One sample had been reduced by adding 5 mg Na-dithionite before being measured, and another had been oxidized by adding 5 mg ammoniumpersulfate to prove the negligibility of cytochrome absorption.

In vivo BChl determination in whole cells. After washing, cells were suspended uniformly in 3 ml of 30% bovine serum albumin solution and then measured at 880 (5) or 375 nm (6) against a corresponding blank.

Chemicals. Bovine serum albumin was obtained from Sigma (St. Louis, U.S.A.). All other chemicals and organic solvents were obtained from Merck (Darmstadt, F.R.G.) and were of analytical grade.

Spectrophotometer. All photometric measurements were carried out in a Shimadzu UV 210 A Double Beam Spectrophotometer at 25°C.

RESULTS

Stability. The aqueous chromatophore preparations appeared to be

stable for several hours when exposed to light. They did not show changes in absorbance either at 880 nm or at 375 nm. Even irradiation for several minutes by a 100 W lamp had no effect.

An instability of BChl in organic solvents when exposed to light was observed by other authors long ago (3,8).

As can be seen from Fig. 1, a solution of BChl in methanol lost 24% in absorbance at 772 nm within the first min at indirect light (2400 lx), 3 min later the remaining absorbance represented 50% of the initial value. By converting BChl into the more stable bacteriopheophytin, according to van Niel and Arnold (4), this drawback could be avoided. An influence of light prior to the conversion could not be eliminated. The solution of BChl in acetone/methanol appeared more stable. Within the first min following the extraction, 7% of the absorbance at 772 nm were lost. After 14 min of exposure to indirect light the absorbance leveled off to 50% (Fig. 1).

Absorbance values in both solvents were found to be stable when the solutions were exposed to infrared light (Fig. 1).

Sufficiency of extraction. No method yielded a total extraction after the first extraction procedure. Values differed from 79.2 to 95.4% for various preparations.

Effect of growth conditions. The extraction methods (772 or 667.8 nm) and the determination in buffer at 375 nm were not influenced by different conditions of growth. In contrast, the determinations in an aqueous buffer in the ir region (5) did reveal specific differences due to the growth conditions (Tab. 1). The wavelengths of the ir maxima as well as the absorbance values in the ir region showed different numbers after various culture conditions, due to the electron source applied (Tab.1).

Effect of cytochrome absorption. Cytochromes do not absorb in the ir region. However, the method using 375 nm light (6) may be influenced by

cytochromes of specific origin. We found that this is not the case for the purple bacteria studied including R. palustris and R. rubrum, further Rhodopseudomonas acidophila, Rhodopseudomonas capsulata, Rhodopseudomonas sphaeroides and Chromatium vinosum.

Linearity. All methods applied showed linearity in the range from 2 to 20 μg BChl per ml except for the determination in buffer at 880 nm (5) which revealed linearity from 2 to 10 μg BChl per ml (Fig.2).

Reproduceability. Due to instability and non-quantitative extraction, the reproduceability of the extraction methods appeared unsatisfactory (Tab.2). For the quantitation given in ref. 4 we calculated a relative standard deviation of 4.2%. The corresponding value according to ref.1 was estimated to be 2.4%. Concerning the reproduceability, the determinations in aqueous buffer revealed better results. The SD_{rel} brought up by the method using 880 nm light was found to be 1.05%, the corresponding value for the determination at 375 nm revealed the most acceptable value of 0.96%.

BChl determination in whole cells by *in vivo* methods. Due to light scattering the use of an *in vivo* determination of BChl in whole cells without using any further treatment was found to be impracticable. Applying the procedure in the presence of BSA which is described elsewhere (8,7,12), a quantitation of BChl in whole cells at 880 (5) or 375 nm (6) became acceptable. The method using BSA is based on the measurement of BChl in whole cells in a medium where the refractive index corresponds closely to that of the cells. Under these conditions light scattering due to gradients of refractive indices between cells and medium is minimized. This was obtained with 30% bovine serum albumin in solution. In whole cells the direct determination at 375 nm in 30% BSA appeared more convenient if compared to the method reported by Sojka et al. (8) who used the difference in the absorbances at 860

and 660 nm to estimate the BChl content.

DISCUSSION

Some of the most important criteria in evaluating an assay method are sensitivity, interferences, convenience, time and costs. The methods investigated are discussed under these aspects.

The disadvantages of the methods mentioned above elucidate the difficulties of the BChl quantitation. Under this point of view, the method using 375 nm light stands as an exception.

In case it becomes necessary to use an extraction method, the procedures must be carried out as quickly as possible and light effects have to be avoided.

A disadvantage of the determination of BChl in buffer at 880 nm, and probably at all other wavelengths in the ir region, has to be seen in the dependence on the conditions of growth. Different growth conditions result in different absorption maxima and absorbance values. This implies changed extinction coefficients.

The reproducibility of the determinations in aqueous solutions is affected only by the manual performance of the assays. In contrast, the reproducibility during quantitations in organic extracts is decreased additionally by a non-sufficient extraction and by the sensitivity towards light. For these reasons SD values concerning the determinations in buffer were found to be one third of the corresponding data calculated for the extraction methods.

Concerning the advantages and disadvantages of the methods investigated, the following conclusion ought to be viewed. To determine BChl contents of chromatophore preparations, the measurement in aqueous solutions at 375 nm represents the most practicable procedure. No significant interferences restrict this method. Sensitivity and performance appear convenient if compared to all the other methods. In addition, this method

saves time and chemicals.

The method can even be used for the quantitation of BChl in whole cells if one applies the procedure using BSA described above.

REFERENCES

1. Clayton, R.K. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 75, 312-323.
2. Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.R., and Stanier, R.Y. (1957) *J. Cell. Comp. Physiol.* 49, 25-68.
3. Smith, J.H.C., and Benitez, A. (1955) in *Modern Methods of Plant Analysis* (Peach, K., and Tracey, M.V., eds.) Vol. 4, pp. 177-182, Springer Berlin.
4. Van Niel, C.B., and Arnold, W. (1938) *Enzymologia* 5, 244-248.
5. Clayton, R.K. (1963) in *Bacterial Photosynthesis* (Gest, H., San Pietro, A., and Vernon, L.P. eds.), pp. 495-500, Antioch Press, Yellow Springs, OH.
6. Neufang, H., Müller, H., and Knobloch, K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 681, 327-329.
7. Schlegel, H.G., and Pfennig, N. (1961) *Arch. Mikrobiol.* 38, 1-39.
8. Sojka, G.A., Freeze, H.H., and Gest, H. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 578-580.
9. Biebl, H., and Drews, G. (1969) *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektions-Hyg. Abt. 2* 123, 425-436.
10. Thornber, J.P., Trosper, L., and Strouse, C.E. (1978) in *The Photosynthetic Bacteria* (Clayton, R.K., Sistrom, W.R. eds.) pp. 133-160, Plenum Press, New York.
11. Knobloch, K., Eley, J.H., and Aleem, M.I.H. (1971) *Arch. Mikrobiol.* 80, 97-114.
12. Barer, R. (1955) *Science* 121, 709-715.

TABLE 1

DIFFERENCES IN THE IR SPECTRA OF CHROMATOPHORES DEPENDING ON
GROWTH CONDITIONS ^a

organism	<u>R. palustris</u>	<u>R. palustris</u>
(electron source)	(malate)	(thiosulfate)
	375 (1.956)	375 (1.958)
wavelength (absorbance)	805 (1.046)	805 (1.047)
[nm]	869 (1.200)	860 (1.378)

^a Chromatophores were prepared according to materials and methods.
The preparations were adjusted to the same BChl content and the
absorption spectra of the different samples were recorded.

TABLE 2

REPRODUCEABILITY OF THE METHODS INVESTIGATED ^a

method 1		method 2		method 3		method 4	
BChl [μg/m]	$x_i - \bar{x}$	BChl [μg/m]	$x_i - \bar{x}$	BChl [μg/m]	$x_i - \bar{x}$	BChl [μg/m]	$x_i - \bar{x}$
14.7	0.09	13.7	0.29	14.6	0.1	13.7	0.05
14.4	0.21	13.9	0.09	14.6	0.1	13.6	0.05
14.9	0.29	14.2	0.21	14.6	0.1	13.7	0.05
14.2	0.41	13.5	0.49	14.7	0.0	13.4	0.25
14.5	0.11	14.5	0.51	15.0	0.3	13.7	0.05
15.1	0.49	13.2	0.79	14.9	0.2	13.9	0.25
15.0	0.39	14.1	0.11	14.6	0.1	13.8	0.15
14.3	0.31	15.1	1.11	14.7	0.0	13.6	0.05
14.2	0.41	13.4	0.59	14.6	0.1	13.5	0.15
14.9	0.29	14.3	0.39	14.7	0.0	13.6	0.05
$\bar{x} = 14.65$		$\bar{x} = 13.99$		$\bar{x} = 14.7$		$\bar{x} = 13.65$	
$x_{\max} - x_{\min} = 0.9$		$x_{\max} - x_{\min} = 1.7$		$x_{\max} - x_{\min} = 0.3$		$x_{\max} - x_{\min} = 0.5$	

^a BChl determinations were carried out with 10 identical samples per series according to the different methods. The SD values were calculated from the following equations:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad SD_{rel} = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 [\%]$$

SD_{rel} method 1 = 2.4%

SD_{rel} method 3 = 0.96%

SD_{rel} method 2 = 4.2%

SD_{rel} method 4 = 1.05%

method 1 = extraction according to Clayton (1)

method 2 = extraction according to van Niel & Arnold (4)

method 3 = determination at 375 nm in aqueous solutions (6)

method 4 = determination at 880 nm in aqueous solutions (5)

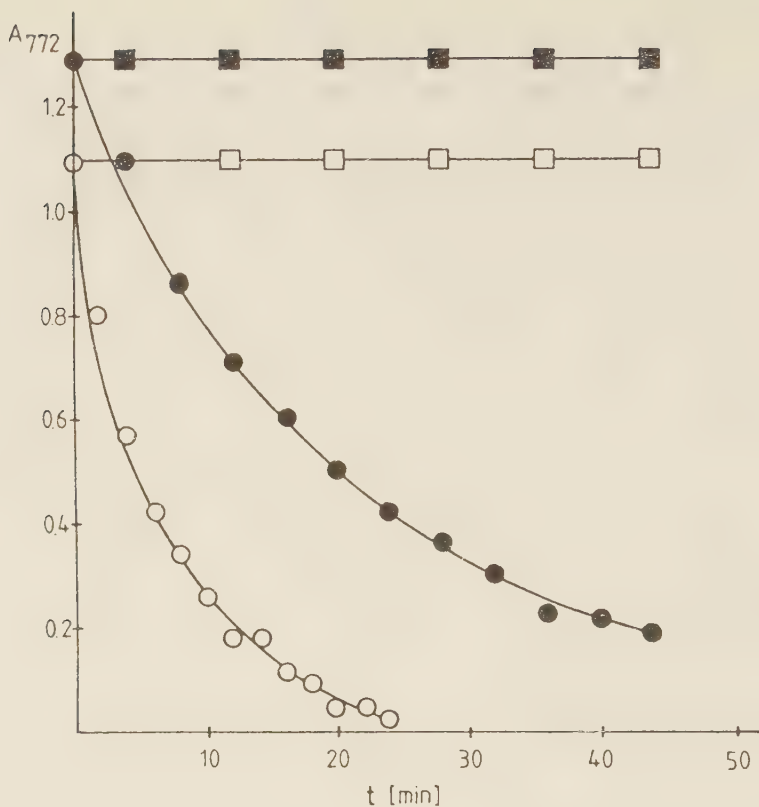


Fig.1 Stability of BChl in organic solvents

Assays were carried out as described under materials and methods.

(●—●) BChl in acetone/methanol (7/2 v/v) when exposed to indirect light

(■—■) BChl in acetone/methanol (7/2 v/v) when exposed to ir light

(○—○) BChl in methanol when exposed to indirect light

(□—□) BChl in methanol when exposed to ir light

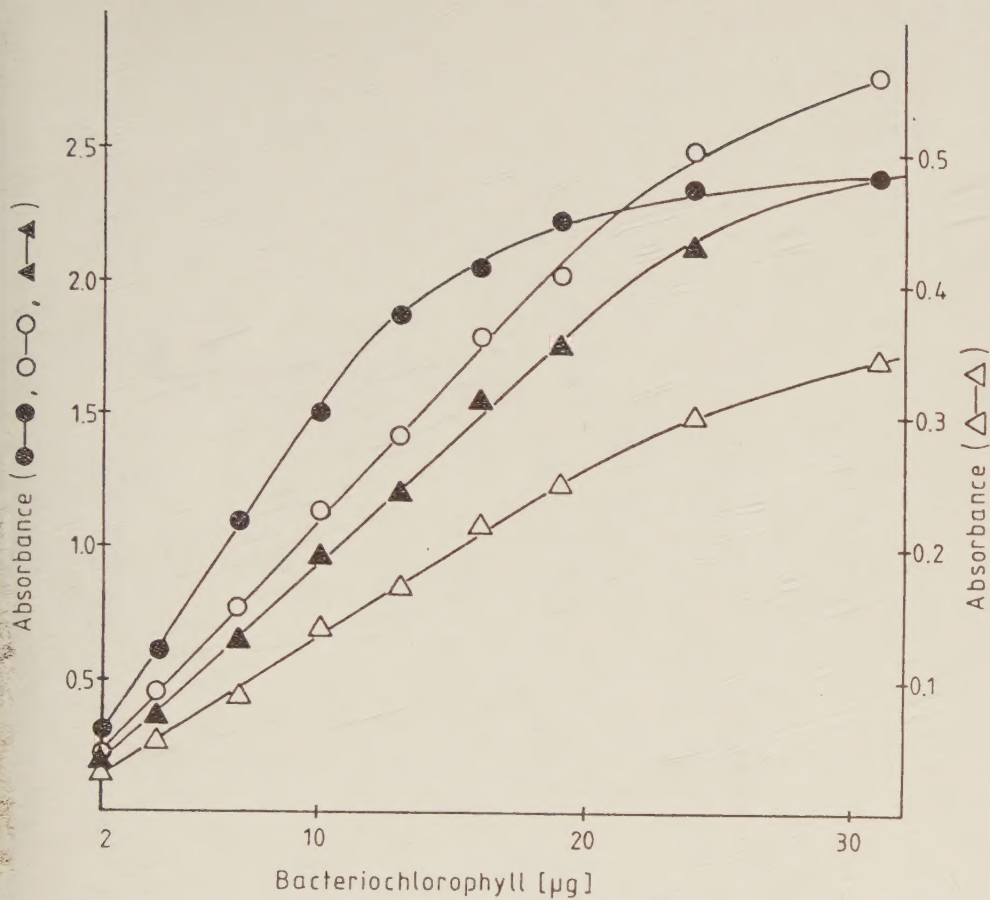


Fig.2 Linearity of the methods investigated

Increasing volumes of chromatophore preparations were measured according to the different methods.

(○—○) determination at 375 nm in aqueous solutions (6)

(●—●) determination at 880 nm in aqueous solutions (5)

(△—△) extraction with methanol (4)

(▲—▲) extraction with acetone/methanol (1)

